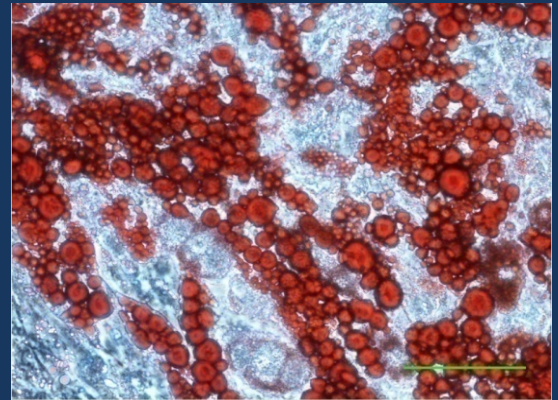
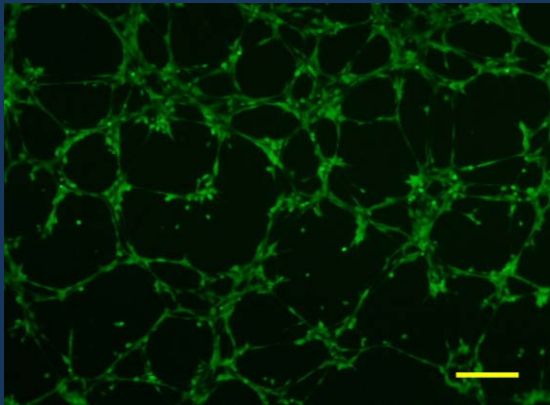
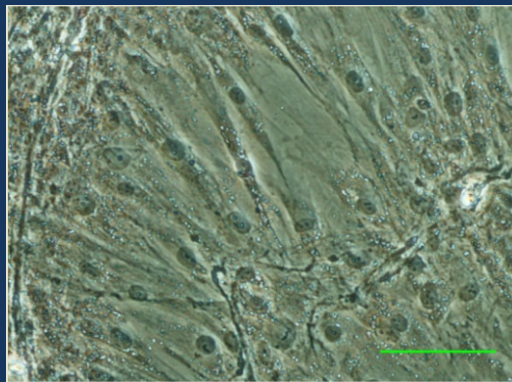


Implicación de las células mesenquimales multipotenciales derivadas del tejido adiposo humano en la patogénesis del síndrome metabólico




Tesis Doctoral
Wilfredo Oliva Olivera

Málaga, Febrero de 2016



Publicaciones y
Divulgación Científica

AUTOR: Wilfredo Oliva Olivera

 <http://orcid.org/0000-0003-3473-7898>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización
pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer
obras derivadas.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de
Málaga (RIUMA): riuma.uma.es

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y

DERMATOLOGÍA



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

TESIS DOCTORAL

**IMPLICACIÓN DE LAS CÉLULAS MESENQUIMALES
MULTIPOTENCIALES DERIVADAS DEL TEJIDO ADIPOSO
HUMANO EN LA PATOGÉNESIS DEL SÍNDROME METABÓLICO**

Memoria presentada por Wilfredo Oliva Olivera para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Málaga, Febrero 2016

El trabajo de investigación que se expone en la presente Tesis ha sido realizado por el licenciado en biología WILFREDO OLIVA OLIVERA en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de Málaga (IBIMA) durante los años 2011-2015, contratado por el CIBERObn y bajo la dirección de:

Dr. FRANCISCO JOSÉ TINAHONES MADUEÑO

Dra. RAJAA EL BEKAY RIZKY

Este trabajo fue cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional-FEDER y financiado por las subvenciones del Ministerio de Sanidad de España (PI13/02628; PI12/02355; FIS PI14/00696; PI12/01373) y del Ministerio Regional de Economía, Innovación, Ciencia y Empleo de la Junta de Andalucía (PII-CTS-08181; CTS-7895).

Dr. FRANCISCO JOSÉ TINAHONES MADUEÑO, PROFESOR TITULAR DEL
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y DERMATOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA.

CERTIFICA:

Que Wilfredo Oliva Olivera ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis
Doctoral: **"Implicación de las Células Mesenquimales Multipotenciales
Derivadas del Tejido Adiposo Humano en la Patogénesis del Síndrome
Metabólico"** durante los años 2011-2015.

El trabajo que se expone en la memoria de la Tesis Doctoral corresponde
fielmente a los resultados obtenidos. Considero que tiene el contenido y el rigor
científico necesario para ser sometida a juicio por el tribunal que en su día
designa la Universidad de Málaga para optar al grado de Doctor en Ciencias
Biológicas.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones legalmente vigentes a
los efectos oportunos, expido el presente en Málaga, 21 de Diciembre de 2015.

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA REGISTRO GENERAL
Entrada
Nº. 201500100015651
10/11/2015 12:30:16

Fdo. Francisco José Tinahones Madueño

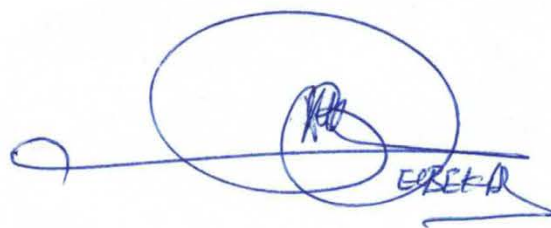
Dra. RAJAA EL BEKAY RIZKY

CERTIFICA:

Que Wilfredo Oliva Olivera ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral: **“Implicación de las Células Mesenquimales Multipotenciales Derivadas del Tejido Adiposo Humano en la Patogénesis del Síndrome Metabólico”** durante los años 2011-2015.

El trabajo que se expone en la memoria de la Tesis Doctoral corresponde fielmente a los resultados obtenidos. Considero que tiene el contenido y el rigor científico necesario para ser sometida a juicio por el tribunal que en su día designe la Universidad de Málaga para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Y para que conste, en cumplimiento de las disposiciones legalmente vigentes a los efectos oportunos, expido el presente en Málaga, 21 de Diciembre de 2015.



Fdo. Rajaa El Bekay Rizky

Dedicado a mi Familia,

Que aunque lejos, siempre están conmigo...

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi novia Rosa María toda su comprensión, paciencia y apoyo emocional durante estos años. A su familia Pérez de Gracia y Navarro por su cariño, acogerme como un miembro más de la familia y hacerme sentir menos lejos de Cuba.

Mis más sinceros agradecimientos a todos los colegas del laboratorio: Maribel Queipo, María Fernanda Lara, Bernardo Herrera, José Carlos Fernández, Sonsoles Morcillo, Gracia María Martín, Isabel Moreno, Manuel Macías, Jaime Gómez-Millán, Bella Pajares, Concepción Santiago, Lidia Sánchez, Lourdes Garrido, Eduardo García, Inma Picón, María José Picón, Amanda Cabrera, Inma Moreno, Isabel Aragón, Pilar Luna, Vanesa De Luque, Cristina Fernández, Rosario Chica, Ángela Santonja, Carmen María González, Isabel Pérez, Josefina Ruiz, Mar Roca, Carmen Rueda, Luis Pérez, Mora Murri, Nuria Barbarroja, Adriana Mariel Gentile, Begoña Jiménez, Nieves Casal, Alicia Guerrero. Muchas gracias a todos por las muestras de afecto, solidaridad, jovialidad, tolerancia, amistad y especialmente por hacerme sentir como un cubano español...

Deseo dejar constancia de mis agradecimientos a Leticia Coín Aragüez y Said Lhamyani por permitirme contar con su tiempo y brindarme su colaboración en la aplicación de la técnica qPCR a los experimentos sobre adipogénesis-21 días. Muchas gracias a Mercedes Clemente Postigo, Daniel Cartellano Castillo, Adrián Alberto Castillo y al profesor José Lozano por sus recomendaciones, sugerencias, asesoramiento e intercambios de opiniones durante todos estos años.

Agradezco a Rosa Bernal López y a Juan Alcaide Torres por su mediación en la disponibilidad de biopsias, sin cuya implicación, compromiso y poder de

convencimiento difícilmente hubiera sido posible terminar éste trabajo. Mi agradecimiento al equipo de cirujanos y enfermeros del Hospital Civil y del Hospital Virgen de la Victoria por su disposición a colaborar en el estudio y especialmente a todos los participantes en el estudio por su consentimiento a donar tejido y favorecer el progreso de las investigaciones biomédicas.

Muchas gracias a la técnica responsable del laboratorio Alicia Céspedes Vidal por su actitud, eficacia y disposición a resolver cualquier incidencia, independientemente de la hora del día, surgida durante la utilización del instrumental del laboratorio. También quiero dejar constancia de mis agradecimientos al Dr Fernando Cardona por su gestión como coordinador del laboratorio, cuyas funciones no sólo han garantizado el funcionamiento eficaz de la infraestructura científica disponible sino también nos ha favorecido a todos mediante su intervención a diferentes niveles de la dirección científica del IBIMA. La mediación de Alicia Céspedes Vidal y Fernando Cardona en el mantenimiento y buen uso del equipamiento del laboratorio me han permitido contar todo el tiempo con la infraestructura necesaria para llevar a cabo los experimentos.

Quiero agradecer especialmente a mis directores de tesis Dr Francisco Tinahones Madueño y Dra Rajaa El Bekay Rizky por su dirección, supervisión, paciencia, apoyo, confianza, y por brindarme la oportunidad de formar parte del grupo de investigación durante estos años de crisis socioeconómica en los que la investigación se ha visto afectada por restricciones presupuestarias.

Ha sido todo un privilegio y honor contar con todas y todos ustedes.

Muchas gracias.

ÍNDICE

ÍNDICE

Abreviaturas	5
Resumen	8
Índice de Tablas y Figuras	9
I-PLANTEAMIENTO GENERAL Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	11
II-INTRODUCCIÓN	
1-Definición, Nicho e Identidad de las Células Mesenquimales Multipotenciales.....	14
2-Propiedades Funcionales de las Células Mesenquimales Multipotenciales..	26
3-Determinación, Diferenciación Adipogénica y Celularidad Adiposa	38
4-Condicionantes Tisulares Asociados a la Disfunción Tisular Adiposa: estrés oxidativo, hipoxia e inflamación.....	47
5-Deterioro Adipogénico del Tejido Adiposo	55
6-Deterioro Microvascular en la Obesidad	60
7-Fibrosis Tisular Adiposa	65
III-HIPÓTESIS y OBJETIVOS.....	71
IV-MATERIALES Y MÉTODOS	
1-Reclutamiento y Agrupamiento de los Sujetos.....	74
2-Aislamiento y Expansión de la Fracción Vascular Estromal Derivada del Tejido Adiposo Visceral y Subcutáneo	75
3-Characterización Inmunofenotípica por Citometría de Flujo.....	77
4-Diferenciación Adipogénica.....	78
5-Ensayo de Susceptibilidad a la Apoptosis.....	79

6-Determinación del Tiempo de Doblaje Poblacional	80
7-Ensayo de Unidades Formadoras de Colonias Fibroblásticas	81
8-Ensayo de Formación de Túbulos Endoteliales por las ASCs	82
9-Ensayo de Quimiotaxis de las ASCs Inducido por el SDF1α	82
10-Obtención del Medio de Cultivo Condicionado por las ASCs.....	83
11-Evaluación de la Bioactividad del Medio Condicionado por las ASCs sobre la Supervivencia y Formación de Túbulos por las HUVECs.	84
12-Determinación de la Concentración de Citoquinas Secretadas por las ASCs... ..	86
13-Extracción del RNA	87
14-Síntesis del DNA Complementario y qPCR.....	88
15-Extracción de Proteínas Citoplasmáticas y Western Blot.....	90
16-Análisis Estadístico	92

V-RESULTADOS

1-Implicación de las ASC Visceral y Subcutáneo en la Remodelación Tisular Adiposa	93
1.1-Characterización antropométrica y perfil metabólico de los sujetos.....	93
1.2-Disminución de los niveles de expresión del RNAm GLUT4 en las ASC visceral y subcutáneo de sujetos SM	93
1.3-La disminución del RNAm GLUT4 en las ASC visceral y subcutáneo está correlacionada con el incremento de los niveles de expresión de proteínas fibróticas.....	98
1.4-Menor susceptibilidad a la apoptosis, pero mayor tiempo de doblaje poblacional en las ASC de sujetos SM	101

1.5-Incremento del potencial clonogénico y de la concentración del FGF2 retenido en la superficie de las ASC subcutánea de los sujetos NoSM	104
2-Contribución de las ASC Visceral y Subcutáneo a la Disminución de la Capacidad Angiogénica del Tejido Adiposo	106
2.1-Disminución de la capacidad de formación de túbulos e incremento de los niveles de expresión de NADPH oxidasa en las ASC visceral y subcutáneo de sujetos SM	106
2.2-Disminución de los niveles de secreción del VEGF por las ASC subcutáneo de los sujetos SM durante la diferenciación adipogénica	110
2.3-Incremento transcripcional de citoquinas inflamatorias durante la diferenciación adipogénica de las ASC subcutáneo de los sujetos SM	113
2.4-Efectos del medio de cultivo condicionado por las ASC visceral y subcutáneo sobre la supervivencia y tubulogénesis de células endoteliales.....	116
3-Efectos de la Hipoxia sobre la Respuesta Neovascular e Inflamatoria de las ASC Visceral según el Perfil Metabólico de los Sujetos	118
3.1-Capacidad de formación de túbulos y niveles de secreción del VEGF y HGF en las ASC visceral bajo condiciones de hipoxia.....	118
3.2-Las ASC visceral de sujetos SM mostraron un incremento del porcentaje de células CD140b⁺ y de la capacidad de migración bajo condiciones de hipoxia.....	120
3.3-Alteraciones en los niveles de expresión de miembros de la familia NADPH oxidasa y de citoquinas inflamatorias en las ASC visceral expuestas a condiciones de hipoxia.....	122
3.4-Bioactividad del medio condicionado por las ASC visceral cultivadas bajo hipoxia.....	124

VI-DISCUSIÓN

1-Las ASC podrían contribuir a la remodelación tisular adiposa observada en sujetos obesos resistentes a la insulina: posible papel protector del FGF2 ... 127

2-Deterioro de las propiedades neovasculares de las ASC visceral y subcutáneo de sujetos obesos con resistencia a la insulina 132

3-Las ASC visceral de sujetos SM evidencian una respuesta neovascular deficiente bajo condiciones de hipoxia 138

VII-CONCLUSIONES 143

BIBLIOGRAFÍA 144

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ADN	Deoxyribonucleic acid
APC	Allophycocyanin
ARN	Ribonucleic acid
ASCs	Multipotent adipose tissue-derived mesenchymal stem cells
BMI	Body mass index
C/EBP α	CCAAT/enhancer binding protein
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Complementary DNA
ChREBP	Carbohydrate-responsive element-binding protein
Col1a1	Collagetype I alpha 1
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	The enzyme-linked immunosorbent assay
FABP4	Fatty acid binding protein 4
FBS	Fetal bovine serum
FCS	Fetal calf serum
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FN1	Fibronectin 1
GFP	Green fluorescent protein
HDL cholesterol	High-density lipoproteincholesterol.
HGF	Hepatocyte growth factor
HIF	Hypoxia-inducible factor
HLA	Human leukocyte antigen
HOMA-IR	Homeostasis model assessment to quantify insulin resistance
HUVECs	Human umbilical cord vein endothelial cells

IBIMA	Instituto de Investigaciones Biomédicas de Málaga
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
IgG	Immunoglobulin G
IL	Interleukin
LDL cholesterol	Low-density lipoproteincholesterol.
LPL	Lipoprotein lipase
MCP1	Monocytes chemoattractant protein
MHC	Major histocompatibility complex
miRNAs	Micro RNAs
MSC	Mesenchymal stem cell
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase
NF- κ B	Nuclear factor- κ B
NG2	Neural/glial antigen 2
NoSM	Sin síndrome metabólico
NOX	Subtipo de NADPH oxidasa
Np	Sujetos normopesos
P S	Presión sanguínea
PBS	Phosphate-buffered saline
PDGF-D	Platelet derived growth factor-D
PDT	Population doubling time
PE	Phycoerythrin
PECAM	Platelet endothelial cell adhesion molecule
PE-Cy7	Phycoerythrin Cyanine7 tandem fluorochrome
Pg	picogramos
PI	Propidium iodide
PPAR γ	Peroxisome proliferator activated receptor- γ
R	Coeficiente Rho de Spearman

RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
RPL13A	Ribosomal protein L13a
RQ	Relative quantification
RT-qPCR	Real-time quantitative PCR
SASP	Senescence associated secretory phenotype
SDF1 α	Stromal cell-derived factor-1 α
siRNA	Small interfering RNA
SM	Con síndrome metabólico
SMA	Smooth muscle actin
SOD1	Superoxidedismutase 1 cytoplasmic
SOD3	Superoxidedismutase 3 extracellular
Sub	Tejido adiposo subcutáneo
SVF	Stromal Vascular Fraction
TGF β 1	Transforming growth factor β 1
TGF β -R	Transforming growth factor β receptor
TNF α	Tumor necrosis factor- α
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
VCAM	Vascular cell adhesion protein
VEGF	Vascular endotelial growth factor
Vis	Tejido adiposo visceral

RESUMEN

RESUMEN

Introducción: La disminución de la capacidad de expansión del tejido adiposo juega un papel crucial en el origen y desarrollo de los trastornos asociados al síndrome metabólico.

Hipótesis y Objetivos: Considerando que la expansión del tejido adiposo depende del estado de sus células mesenquimales multipotenciales (ASCs), es probable que las condiciones tisulares asociadas a los períodos de balance energético positivo generen alteraciones en los patrones heredables de transcripción génica mediante los que las ASCs quedan predispuestas a favor del fenotipo fibrótico e inflamatorio, en detrimento de su función adipogénica y neovascular. Para corroborar ésta hipótesis nos propusimos revelar la implicación de las ASCs en la remodelación tisular adiposa; su contribución a la disminución de la capacidad angiogénica del tejido adiposo; y evaluar su respuesta neovascular, migratoria e inflamatoria ante la hipoxia. **Metodología:** Aplicamos técnicas de cultivo celular, citometría de flujo, qPCR, western blot y ELISA a las ASCs aisladas del tejido adiposo visceral y subcutáneo de 69 sujetos agrupados en normopesos, y obesos con (SM) y sin síndrome metabólico (NoSM). **Resultados:** Los adipocitos generados a partir de las ASC visceral y subcutáneo evidenciaron una disminución en los niveles intrínsecos de expresión del transportador de glucosa GLUT4 conforme aumenta la expresión de proteínas fibróticas, el BMI y el HOMA-IR de los pacientes. El empeoramiento del perfil metabólico de los sujetos estuvo acompañado por la disminución de la tasa proliferativa, el potencial clonogénico y la exportación del FGF2 hacia la superficie celular de las ASC derivadas de ambos tejidos. Las ASC visceral y subcutáneo de los sujetos SM también mostraron una disminución en la capacidad de formación de túbulos respecto a las ASCs de los sujetos obesos NoSM así como alteraciones en los niveles de expresión de proteínas implicadas en el balance redox celular y vinculadas al fenotipo secretor asociado a senescencia. El deterioro de las propiedades neovasculares de las ASC subcutáneo de los sujetos SM se evidenció además en los niveles de secreción del VEGF durante la adipogénesis y en los efectos del medio condicionado adipogénico sobre la formación de túbulos por células endoteliales. Aunque las ASC visceral de los sujetos SM cultivadas bajo hipoxia mostraron mayor porcentaje de células CD140b⁺/CD44⁺ y CD140b⁺/CD184⁺ así como mayor capacidad migratoria que las ASC visceral de los sujetos NoSM, también evidenciaron menor capacidad de formación de túbulos, transcribieron más RNAm NOX5 y su medio condicionado disminuyó la supervivencia de las células endoteliales. **Conclusiones:** El funcionamiento del tejido adiposo parece condicionar el deterioro de sus propias células precursoras y ante el cual las ASCs de los sujetos que desarrollan síndrome metabólico son más vulnerables.

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Criterios para el diagnóstico clínico del síndrome metabólico.	74
Tabla 2. Genes evaluados por qPCR, con su respectivo código y secuencia de referencia según instrucciones de Applied Biosystem.	89
Tabla 3. Características biológicas y clínicas de los sujetos normopesos, pacientes sin síndrome metabólico y pacientes con síndrome metabólico.	94
Figura 1. Aislamiento y expansión de la fracción vascular estromal derivada del tejido adiposo.	76
Figura 2. Morfología y diversidad de tamaños de las colonias generadas por el cultivo a baja densidad de las ASCs.	81
Figura 3. Caracterización inmunofenotípica de las ASC visceral y subcutáneo en pase tres de sujetos con perfiles metabólicos diferentes.	95
Figura 4. Diferenciación adipogénica de las ASC visceral y subcutáneo durante 21 días.	97
Figura 5. Niveles de expresión del RNAm Glut4 y proteínas asociadas a la fibrosis tisular adiposa.	99
Figura 6. Expresión de proteínas involucradas en la señalización TGF β .	100
Figura 7. Inducción de la apoptosis celular en las ASC visceral y subcutáneo de sujetos obesos con perfiles metabólicos diferentes cultivadas durante 24 horas en medio libre de suero sin y con 100 ng/mL del TNF α .	102
Figura 8. Tiempo de doblaje poblacional (PDT) de las ASC visceral y subcutáneo de sujetos normopesos y obesos con perfiles metabólicos diferentes.	103
Figura 9. Potencial clonogénico y retención del FGF2 en la superficie de las ASC visceral y subcutáneo.	105
Figura 10. Capacidad de formación de túbulos por las ASC visceral y subcutáneo.	107

Figura 11. Expresión de proteínas involucradas en el balance redox celular en las ASC visceral y subcutáneo.	109
Figura 12. Diferenciación adipogénica de las ASC visceral y subcutáneo durante seis días.	111
Figura 13. Concentración del VEGF en el medio adipogénico condicionado por las ASC visceral y subcutáneo.	112
Figura 14. Concentración del HGF en el medio adipogénico condicionado por las ASC visceral y subcutáneo.	114
Figura 15. Expresión de citoquinas inflamatorias por las ASC visceral y subcutáneo.	115
Figura 16. Bioactividad del medio condicionado adipogénico por las ASC visceral y subcutáneo.	117
Figura 17. Capacidad de formación de túbulos y secreción de citoquinas angiogénicas por las ASC visceral expuestas a hipoxia.	119
Figura 18. Caracterización inmunofenotípica de las ASC visceral cultivadas durante 72 horas bajo condiciones de normoxia (21 % O _{2 (g)}) o hipoxia (1 % O _{2 (g)}).	121
Figura 19. Efectos del SDF1 α sobre la migración de las ASC visceral cultivadas previamente bajo condiciones de normoxia (21 % O _{2 (g)}) o hipoxia (1 % O _{2 (g)}).	122
Figura 20. Expresión de NOX4 y NOX5 en las ASC visceral sometidas durante 72 horas al 1 % O _{2 (g)} .	123
Figura 21. Expresión de citoquinas inflamatorias por las ASC visceral cultivadas durante 72 horas al 1 % O _{2 (g)} .	125
Figura 22. Bioactividad del medio condicionado por las ASC visceral cultivadas durante 72 horas al 1 % O _{2 (g)} .	126

PLANTEAMIENTO Y JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Planteamiento General y Justificación del Estudio.

El síndrome metabólico es considerado actualmente como una serie consecutiva de trastornos caracterizado por un exceso de tejido adiposo en la cavidad abdominal, hipertensión arterial, hiperglucemia en ayunas, disminución del colesterol unido a la lipoproteína de alta densidad y aumento de los triglicéridos en la sangre (Guyton y Hall, 2011). Este trastorno metabólico está estrechamente vinculado a la incidencia de diabetes tipo 2, a las enfermedades cardiovasculares (Hajer *et al*, 2008) y se estima que su prevalencia en los países más industrializados es de aproximadamente el 20 % de la población, llegando a superar el 40 % en las personas mayores de 60 años (Lechleiterer, 2008).

Si bien el síndrome metabólico se ha concebido como una entidad no uniforme, cuya sintomatología podría ir desde un conjunto de factores de riesgo no relacionados a una constelación de factores de riesgo vinculados a través de un mecanismo subyacente común (Grundy *et al*, 2005), cada vez más estudios sugieren que la obesidad podría ser el factor subyacente por el que se manifiestan los componentes del síndrome metabólico (Khan, 2007). De hecho, se piensa que el incremento poblacional de la obesidad es el principal responsable de la prevalencia del síndrome metabólico y especialmente de la resistencia a la insulina que acompaña a la hiperglucemia (Grundy *et al*, 2004). Sin embargo, ha sido admitido que entre el 3 % y el 57 % de los sujetos obesos no desarrollan trastornos metabólicos asociados con la obesidad (Primeau *et al*, 2011; Plourde *et al*, 2014) y existen sujetos que sin ser obesos padecen de resistencia a la insulina (Conus *et al*, 2004; Scott *et al*, 2014).

Es ampliamente reconocido que durante períodos de balance energético positivo, en los que la ingesta calórica supera al gasto, la mayor parte del exceso de energía generado se almacena en el tejido adiposo blanco, que tiene la propiedad de expandirse mediante el aumento del número (hiperplasia) y del tamaño (hipertrofia) de los adipocitos. De éste modo se ha sugerido que el riesgo de desarrollar síndrome metabólico probablemente no depende de la cantidad absoluta de grasa acumulada sino más bien de que la ingesta calórica sobrepase la capacidad de expansión del tejido adiposo y en consecuencia se almacene en otros órganos no adiposos como el hígado, páncrea y músculo, causando resistencia a la insulina por un mecanismo lipotóxico (Sethi y Puig, 2007). Este planteamiento, conocido como hipótesis de la expandibilidad del tejido adiposo, presupone que la capacidad máxima de expansión del tejido adiposo varía entre los sujetos y está determinada por múltiples factores como el número de preadipocitos preexistentes, los programas genéticos de adipogénesis, vasculogénesis así como la funcionalidad de otros componentes celulares dentro del tejido adiposo (Yew y Vidal-Puig, 2008; Virtue y Vidal-Puig, 2008).

Aunque la resistencia a la insulina que acompaña al síndrome metabólico involucra en efecto a los tejidos adiposo, muscular esquelético y hepático, múltiples evidencias indican que la disfunción del tejido adiposo blanco también juega un papel crucial en el origen, progresión y desarrollo de la resistencia a la insulina asociada a la obesidad (Shoelson *et al*, 2006; Goossens, 2008; Guilherme *et al*, 2008). De éste modo, se ha sugerido que la preservación de la arquitectura y funcionalidad del tejido adiposo también podría contribuir a que

no todos los individuos obesos desarrollen trastornos metabólicos y cardiovasculares asociados a la obesidad (Blüher, 2009).

Considerando que la funcionalidad del tejido adiposo blanco depende del estado de sus células precursoras, que va a garantizar tanto la renovación a largo plazo de los adipocitos como la disponibilidad a corto plazo de nuevas generaciones celulares comprometidas con el linaje adipogénico, la descripción de las propiedades de las células mesenquimales multipotenciales derivadas del tejido adiposo (ASCs) de sujetos con perfiles metabólicos diferentes podría contribuir a la comprensión de la patogénesis del síndrome metabólico y a prevenir los efectos a largo plazo de los tratamientos farmacológicos contra ésta patología. Debido a la alta prevalencia de la obesidad en la sociedad actual y futura (Bessesen, 2008), el grado de implicación de las ASCs en la patogénesis del síndrome metabólico podría proporcionarnos información sobre la viabilidad del tejido adiposo como fuente alternativa de células para el desarrollo de aplicaciones relacionadas con la terapia celular autóloga.

INTRODUCCIÓN

1-Definición, Nicho e Identidad de las Células Mesenquimales Multipotenciales.

Definición.

Las células troncales (stem cells) se definen como células capaces de autorrenovación y diferenciación celular (Ramolho-Santos y Willenbring, 2007). Estos dos atributos las hacen responsables del desarrollo, renovación, reparación y mantenimiento de la arquitectura tisular (Alberts *et al*, 2004) y son las propiedades por las que se les ha llegado a considerar unidades de evolución por selección natural (Weissman, 2000). Aunque se ha sugerido que el concepto de células troncal sea concebido como una función biológica inducible en muchos tipos celulares independientemente de su estado de diferenciación (Blan *et al*, 2001), cada vez más estudios corroboran que la autorrenovación y diferenciación son atributos exclusivos de determinadas células del organismo.

La autorrenovación es la propiedad inherente a las células troncales mediante la que pueden generar células idénticas en fenotipo y potencialidad a la población celular original (Bianco *et al*, 2008), preservando indefinidamente el estado troncal indiferenciado (Kolf *et al*, 2007). Este atributo distingue a las células troncales de las progenitoras, que sólo pueden diferenciarse (Alberts *et al*, 2004). De hecho, las células progenitoras son descendientes de las células troncales y, a diferencia de éstas, suelen atravesar una sucesión limitada de divisiones celulares rápidas (amplificación clonal) antes de diferenciarse finalmente (Alberts *et al*, 2004). La preservación del estado troncal indiferenciado depende de que al menos una de las células hijas herede los determinantes proteicos reguladores de la autorrenovación mediante un

mecanismo dependiente de la orientación del huso mitótico respecto al nicho (mecanismo extrínseco) o respecto a la propia división celular (mecanismo intrínseco) (Knoblich, 2008). Aunque las células troncales de muchos tejidos adultos no se dividen con mucha frecuencia (Alberts *et al*, 2004), ocasionalmente pueden hacerlo generando dos células hijas idénticas que contribuyen a aumentar el número o compensar la pérdida de células troncales asociadas a los períodos en los que haya prevalecido la diferenciación celular de las células hijas (Knoblich, 2008). Entre las citoquinas implicadas en el mantenimiento de la troncosidad de las células mesenquimales en particular se encuentran el factor inhibidor de leucemia, los factores de crecimiento fibroblásticos, los factores homólogos en mamíferos de los wingless *Drosophila* Wnts, el factor de crecimiento de hepatocitos y dentro de los marcadores génicos se hallan oct4, sox2 y rex1 (Kolf *et al*, 2007). También se han identificado micro RNAs implicados tanto en el balance entre autorrenovación y determinación celular (Shih-Ping *et al*, 2009) como en la especificación hacia los linajes adipogénico, condrogénico y osteogénico durante la diferenciación celular (Lakshmipathy y Hart, 2008).

La diferenciación celular es el proceso por el que un precursor celular adquiere sus características especializadas definitivas y generalmente deja de dividirse (Alberts *et al*, 2004). Las células troncales han sido clasificadas según su capacidad de diferenciación como: totipotentes, pueden dar lugar a todos los tipos celulares embrionarios y extraembrinarios (células del blastómero o el propio cigoto); pluripotentes, generan todos los tipos celulares de los linajes endodérmico, mesodérmico y ectodérmico (la célula troncal embrionaria); multipotentes, pueden diferenciarse a múltiples tipos celulares de un

determinado linaje (como la célula troncal hematopoyética); oligopotentes, capaces de desarrollarse hacia un conjunto más restringido de linajes celulares que las células troncales multipotentes; unipotentes, que pueden contribuir solamente a un tipo celular, como las espermatogonias que sólo se diferencian a espermatozoides (Wagers y Weissman, 2004; Jaenisch y Young, 2008).

La célula troncal mesenquimática es la célula precursora de la mayoría de las células derivadas del mesodermo y sus linajes incluyen hueso, cartílago, tendón, adiposo, músculo liso, músculo esquelético, y probablemente células endoteliales y miocárdicas (Bianco *et al*, 2008). Hace más de una década se viene corroborando que clones de células procedentes del tejido adiposo subcutáneo y visceral pueden ser inducidas a la expresión de genes y proteínas específicas de linajes adipogénicos, condrogénicos, osteogénicos, miogénicos, neural, endotelial y cardíaco (Zuk *et al*, 2002; Fraser *et al*, 2006; Baglioni *et al*, 2009). Aunque la célula troncal hematopoyética se ha establecido como el prototipo de célula troncal (Ramalho-Santos y Willenbring, 2007), no existen evidencias sólidas para la organización jerárquica de las poblaciones mesenquimales (Zipari, 2005). El aislamiento de subpoblaciones de ASC mediante micromoldes magnéticos tratados con anticuerpos contra proteínas de superficie celular (Stro1; p75; CD: 29; 44; 49d; 73; 90; 105) ha puesto de manifiesto la diversidad poblacional de las ASC y la variabilidad en su capacidad de diferenciación condrogénica y osteogénica (Rada *et al*, 2011).

También se ha constatado que los preadipocitos pueden desarrollar actividad fagocítica, expresar proteínas específicas de macrófagos (Cousin *et al*, 1999; Charrière *et al*, 2003) y que los adipocitos mamarios de ratones se transforman hacia células epiteliales secretoras durante la preñez, revirtiendo hacia

adipocitos después de la lactación (Marroni *et al*, 2004). Sin embargo, éste fenómeno de transdiferenciación, definido como un mecanismo por el que las células troncales mesenquimales (MSC) podrían contribuir a tipos celulares de linajes diferentes al mesenquimático (Wagers y Weissman, 2004; Jaenisch y Young, 2008), es raro entre las MSC y no podría ser utilizado para la producción celular a gran escala (Bieback *et al*, 2012).

Aunque la capacidad de diferenciación multilínea de las células troncales mesenquimales derivadas del tejido adiposo (ASC) es una de las características que ha contribuido a incrementar las expectativas para su uso biomédico, existen otras razones por las que se les consideran actualmente las candidatas idóneas para el uso en terapia celular e ingeniería tisular: su frecuencia relativamente elevada dentro del tejido adiposo, combinado con la accesibilidad quirúrgica del tejido adiposo y su alto rendimiento comparado con el de las células precursoras derivadas de la médula ósea ((Fraser *et al*, 2006); sus tasas elevadas de proliferación durante la expansión *in vitro* (Nakagami *et al*, 2006); la eficiencia relativamente alta con la que pueden ser manipuladas con vectores adenovirales, oncoretrovirales y lentivirales (Strem *et al*, 2005); así como la carencia de expresión de antígenos HLA-DR y otros inmunógenos (Schäffler y Büchler, 2007; Bunnell *et al*, 2008). Sin embargo, el éxito de la aplicabilidad biomédica de cualquier célula troncal dependerá en última instancia del conocimiento y comprensión de sus propiedades estructurales y funcionales.

Nicho e Identidad.

La identificación exacta de las células troncales permanece como uno de los mayores obstáculos para el progreso en la comprensión de la biología de las células troncales en general (Morrison y Spradling, 2008). Aún no ha sido identificado un marcador o configuración de marcadores que permita definir únicamente a las MSC (Bieback *et al*, 2012) y muchos de los marcadores mediante los que se aborda el estudio de las MSC son expresados también por cultivos de células fibroblásticas (Bianco *et al*, 2008; Wagner *et al*, 2005). Además, definir a las MSC *in vitro* ha complejizado su estudio debido a que las condiciones artificiales pueden introducir artefactos experimentales (Da Silva *et al*, 2008) y a la diversidad de métodos de aislamiento, fuente celular inicial y condiciones de cultivo aplicadas en laboratorios diferentes (Bieback *et al*, 2012). Por ello, se ha hecho necesario optimizar el aislamiento, las condiciones de cultivo y los análisis por citometría de flujo (Tárnok *et al*, 2010).

La Sociedad Internacional para el Establecimiento de la Terapia Celular ha formulado tres criterios mínimos para definir a las células estromales multipotentes: tener adherencia al plástico bajo condiciones estándares de cultivo celular; que más del 95 % de la población exprese CD73, CD90, CD105 y solamente el 2 % exprese CD45, CD14, CD11b, CD19 y HLA clase II; poder diferenciarse hacia osteoblastos, condroblastos y adipocitos (Dominici *et al*, 2006). También se ha sugerido que, independientemente del tejido del que sean aisladas, se les denomine células estromales mesenquimales multipotentes MSC (Horwitz *et al*, 2005). Sin embargo, recientemente se ha propuesto el uso del acrónimo ASC para referirse a las derivadas del estroma del tejido adiposo, que se distinguen de las derivadas de la médula ósea

fundamentalmente por su positividad para CD36 y negatividad para CD106 (Bourin *et al*, 2013).

El estroma o mesénquima es un término anatómico que hace referencia al tejido conjuntivo de cualquier órgano, y está asociado a la función trófica y de sostén de los tipos celulares especializados de los órganos que se encuentran formando el parénquima (Bianco *et al*, 2008). Se han desarrollado numerosos estudios dirigidos a dilucidar la localización precisa y el nicho de las MSC dentro del estroma.

El nicho representa el conjunto de elementos que rodean inmediatamente a las células troncales cuando están en su estado nativo e incluye células no troncales, que podrían estar en contacto directo con ellas, así como matriz extracelular y moléculas solubles (Kolf *et al*, 2007). De éste modo, para que un determinado sitio sea definido como nicho necesariamente tiene que proveer señales a las células troncales residentes y no limitarse a representar simplemente una localización física (Zeve *et al*, 2009). En general, al nicho se le considera como un microambiente dinámico que equilibra la actividad de las células troncales hacia el mantenimiento de la homeostasis y reparación tisular (Morrison y Spradling, 2008; Voog y Jones, 2011). Se ha sugerido que las MSC podrían ocupar un nicho perivascular y su identidad es la del pericito (da Silva *et al*, 2008).

Los pericitos, también conocidos como células murales, están asociadas abluminalmente con todos los capilares vasculares y vénulas poscapilares; están implicados en la regulación del flujo sanguíneo y se ha descrito que pueden diferenciarse hacia adipocitos, osteoblastos y fagocitos (Hirschi y

D'Àmore, 1996). Así, células perivasculares humanas derivadas del músculo esquelético, páncreas, tejido adiposo, placenta, médula ósea, que expresan marcadores reconocidos de MSC (SSEA-4; HLA-CLI; CD:10; 13; 44; 73; 90; 105; 108; 109; 164; 166; 318; 340), se han identificado prospectivamente como pericitos debido a la expresión de CD140b, CD146, NG2 y a la ausencia de expresión de marcadores de células hematopoyéticas, endoteliales y musculares (Crisan *et al*, 2008; Crisan *et al*, 2009). De hecho, se ha observado que el número de unidades formadoras de colonias fibroblásticas, cuyo valor generalmente se asocia con la presencia de células progenitoras (Bianco *et al*, 2008), se correlaciona positivamente con la densidad de vasos sanguíneos en el tejido adiposo equino (da Silva *et al*, 2009).

En el caso particular del tejido adiposo, el mesénquima está contenido en lo que se conoce como fracción vascular estroma (SVF) y cuya definición más bien operativa hace referencia a una mezcla heterogénea de células que son aisladas por disociación enzimática y separada por densidad de los adipocitos que flotan durante la centrifugación (Zeve *et al*, 2009). La SVF adiposa está compuesta de poblaciones celulares heterogéneas que no sólo incluyen células precursoras, sino también eritrocitos, leucocitos circulantes, macrófagos residentes, pericitos, fibroblastos, células endoteliales, células musculares lisas vasculares (Shäffer y Büchler, 2007; Bunnell *et al*, 2008). Además, su composición final podría ser influida por las técnicas usadas para su aislamiento, la caracterización inmunofenotípica (Astori *et al*, 2007); así como por las condiciones de cultivo celular, alejadas de la arquitectura tisular nativa (Zeve *et al*, 2009) y capaces de alterar los perfiles de transcripción génica

(Boquest *et al*, 2005) e introducir cambios temporales en los marcadores de superficie celular según los pases de cultivo (Mitchell *et al*, 2006).

Una estrategia implementada para minimizar dichas limitaciones es disociar el tejido adiposo, clasificar las células según los marcadores de superficie celular y, después de aislar fracciones celulares específicas, describir el potencial de diferenciación de las diferentes fracciones tanto *in vitro* como *in vivo* (Zeve *et al*, 2009). Así se ha llegado a conocer que las ASC humanas tienen un fenotipo de expresión similar al de las células estromales derivadas de la médula ósea e incluye marcadores como CDs: 9; 10; 13; 29; 34; 44; 49d; 49e; 54; 55; 59; 105; 106; 146; 166 (Gronthos *et al*, 2001).

Usando modelos de ratones creados genéticamente para aislar progenitores adiposos, junto con métodos inmunohistoquímicos combinados con técnicas de marcaje GFP, también se ha demostrado que las células progenitoras adiposas residen en el compartimento de la célula mural de la vasculatura adiposa, coexpresando marcadores de células murales SMA, CD140b, NG2 (Tang *et al*, 2008; Zeve *et al*, 2009). Interesantemente, en estos estudios también se demostró que las células CD140b⁺ de la vasculatura adiposa, pero no la de otros órganos, tienen un potencial adipogénico alto y considerablemente mayor que el de las células CD140b⁻.

Otro estudio independiente también ha sugerido la identidad pericítica de las ASC porque corroboró la presencia de una población de células estromales adiposas CD34⁺CD31⁻CD144⁻ multipotenciales que comparten marcadores de superficie celular mesenquimales (CD10; 13; 90), pericíticos (NG2, CD140a; CD140b) y estuvieron localizadas sobre la superficie exterior de los vasos del

tejido adiposo (Traktuev *et al*, 2007). Además, los experimentos de cocultivo de células CD34⁺CD31⁻CD144⁻ con células endoteliales microvasculares humanas desarrollados en este estudio permitieron confirmar la formación de redes endoteliales estables, en las que las ASC se localizaron preferentemente sobre el lado abluminal de los cordones vasculares y desarrollaron interacciones paracrinas mediadas por la secreción de citoquinas angiogénicas VEGF, HGF y FGF2.

La localización perivascular de las ASC también se ha corroborado *in vivo* mediante el marcaje inmunofluorescente de secciones de tejido adiposo humano, en el cual se ha constatado la presencia de células STRO1⁺CD146⁺3G5⁺ alrededor de los vasos sanguíneos, y cuyo aislamiento y caracterización por citometría de flujo confirmó un inmunofenotipo STRO1⁺CD44⁺CD90⁺CD105⁺CD146⁺CD166⁺CD14⁻CD31⁻CD45⁻ (Zannettino *et al*, 2008). Sin embargo, en otro estudio más exhaustivo, donde se caracterizaron cuatro poblaciones celulares asociadas a los vasos sanguíneos del tejido adiposo humano, se constató que los pericitos (CD146⁺CD34⁻) son las células de mayor potencial adipogénico, las células supradventiciales (CD146⁻CD34⁺) son las más abundantes, mientras que otra subpoblación (CD146⁺CD34⁺) representa más bien una población de transición entre pericitos y las células supraadventiciales (Zimmerlin *et al*, 2010).

A pesar de que estas evidencias sugieren que los pericitos sean ASC, estudios inmunohistoquímicos indican que los pericitos son células CD34⁻ componentes del nicho y que las ASC pueden residir en la adventicia de las arterias y arteriolas comportándose más bien como células troncales vasculares en varios estados de diferenciación hacia células endoteliales y musculares lisas

vasculares (Lin *et al*, 2008). De éste modo, se piensa que las ASC existen como células $CD34^+CD31^-CD140b^-SMA^-$ en los capilares adiposos (coexistiendo con pericitos $CD34^-CD140b^+SMA^+$ y células endoteliales $CD34^+CD31^+$) y en la adventicia de los vasos mayores comportándose como células troncales vasculares (Lin *et al*, 2010).

Aunque CD34 es un marcador de célula progenitora hematopoyética reconocido ampliamente, se ha demostrado que los preadipocitos derivados del tejido adiposo subcutáneo humano están incluido en la fracción celular $CD34^+CD31^-$, que muestra características diferentes a las de las células troncal hematopoyética y mesenquimática de la médula ósea porque no forma colonias de células sanguíneas ni expresa CD105 respectivamente (Sengenès *et al*, 2005). Por otra parte, el monitoreo *in vivo* de la reconstitución de la masa grasa ha permitido identificar una subpoblación de células $CD24^+$ progenitora de adipocitos residente en el tejido adiposo adulto ($CD29^+CD34^+CDSc1^+CD24^+$), que al ser inyectada a ratones lipodistróficos pudieron reconstituir los depósitos adiposos y revertir el fenotipo diabético (Rodekeffer *et al*, 2008). Evidencias posteriores a éste estudio han revelado que la fracción $CD24^-$ ($CD29^+CD34^+CDSc1^+CD24^-$), generada a partir de las células $CD24^+$, también puede ser precursora de adipocitos ya que al dejar de expresar CD24 quedan comprometidas hacia el linaje adipogénico (Berry y Rodekeffer, 2013).

La revelación del marcador o perfil de marcadores por el que se pueda identificar a las ASC aún está pendiente debido, por una parte, a que la mayoría de los marcadores no están relacionados directamente con las células troncales y son expresados sobre linajes no progenitores (Cawthorn *et al*, 2012) y, por otra parte, a su variabilidad temporal *in vitro* (Mitchell *et al*, 2006)

así como a las variaciones en la expresión de marcadores dentro del mismo linaje (Tárnok *et al*, 2010).

La localización perivascular de las ASC y los preadipocitos parece complejizar aún más el asunto porque da lugar a la posibilidad de que el precursor para estas células pueda derivar desde fuera del tejido adiposo (Crisan *et al*, 2008; Cawthorn *et al*, 2012). Se ha sugerido que las células residentes en la vasculatura adiposa y que expresan marcadores de células endoteliales-mural (CD140b, SMA, NG2) podrían estar relacionadas con los mesoangioblastos, es decir, con células troncales pluripotenciales semejantes a las mesenquimales derivadas de pericitos asociados a las paredes de los vasos (Majka *et al*, 2011). A dichas células se les atribuye la generación de células progenitoras endoteliales residentes en los vasos sanguíneos pequeños del tejido dérmico, adiposo y muscular esquelético (Grenier *et al*, 2007). Aunque estas células no expresan marcadores hematopoyéticos, se ha confirmado la existencia de progenitores mesodérmicos primitivos (CD45⁻KDR⁺CD105⁺) dentro de la SVF adiposa capaces de generar colonias hematopoyéticas y a los que se les ha reconocido como hemangioblasto (Miñana *et al*, 2008). Aunque poco abundantes, los hemangioblastos detectados en estado posnatal tienen un potencial proliferativo a largo plazo y capacidad de diferenciación hematopoyética y endotelial tanto *in vitro* como *in vivo* (Pelosi *et al*, 2002).

Múltiples evidencias indican que progenitores no residentes en el tejido adiposo podrían contribuir a la población de adipocitos blancos, dentro de los que destacan las células hematopoyéticas con características mesenquimales (Majka *et al*, 2011) y en especial las células multipotenciales derivadas de monocitos (Seta y Kuwana, 2010). Estas células podrían ser inducidas a

diferenciarse hacia células no fagocíticas en presencia de instrucciones asociadas al daño tisular masivo, generando células específicas del tejido y liberando varios mediadores solubles que promueven la angiogénesis y reparación tisular (Seta y Kuwana, 2007).

Se ha constatado que los monocitos sanguíneos periféricos CD14⁺ pueden generar fibrocitos, que en sujetos sanos comprenden el 0.1-1 % de las células nucleadas circulantes (Keeley *et al*, 2009). Los fibrocitos son una población de progenitores semejantes a fibroblastos que han mostrado capacidad para diferenciarse hacia linajes mesenquimáticos, incluyendo adipocitos, miofibroblastos, fibroblastos (Hang *et al*, 2005; Hong *et al*, 2007) y participan en la remodelación tisular produciendo proteínas de la matriz extracelular (colágeno I, colágeno III, vimentina), secretando metaloproteinasas matriciales así como citoquinas inflamatorias, quimioquinas y factores de crecimiento que median la fibrosis (Keeley *et al*, 2009). Estas células también expresan un conjunto de receptores de quimoquinas, dentro de las que se encuentran CCR7 y CXCR4 (Hong *et al*, 2005), que parecen ser responsables del incremento en el número de adipocitos derivados de progenitores de la médula ósea descrito en ratones tratados con rosiglitazona o sometidos a dieta con contenido alto en grasa (Crossno *et al*, 2006). Se piensa que los fibrocitos son los precursores de la población de células derivadas del linaje mieloide observada en el estroma adiposo, acumulados preferentemente en los depósitos de grasa visceral y cuyo nivel de expresión de citoquinas inflamatorias es superior al de adipocitos blancos convencionales (Majka *et al*, 2011).

Ha quedado demostrado que el potencial adipogénico de los fibrocitos puede ser inhibido en presencia del TGFβ y en condiciones de baja densidad de

cultivo en matriz extracelular de fibronectina (Hong *et al*, 2005). De hecho, experimentos *in vitro* sugieren la existencia de un circuito de señalización, asociado a la señalización SPAK/JNK, que involucra el balance delicado entre vías de diferenciación adipogénica (activadas por PPAR γ) y miofibroblástica (activadas por TGF β), y cuyo estado de activación dependerá del nicho bajo el que se encuentren las células (Hong *et al*, 2007). Desbalances entre estas vías podrían ser responsables de que los niveles elevados de fibrocitos circulantes se hayan visto asociados con el incremento de la fibrosis en estados patológicos pulmonar y cardiaco (Keeley *et al*, 2011).

2-Propiedades Funcionales de las Células Mesenquimales Multipotenciales.

Propiedades Inmunomoduladoras.

Se piensa que la localización perivascular de las células mesenquimales pluripotenciales refuerza su función *in vivo* como estabilizadoras de los vasos sanguíneos, que ante una interrupción de la vasculatura pueden proliferar y secretar factores bioactivos dirigidos a proteger y reparar el daño tisular (da Silva *et al*, 2008). Algunos estudios sugieren que la secreción de citoquinas por las MSC podría tener un papel más relevante para la reparación y el mantenimiento de la homeostasis que la propia diferenciación celular (Phinney y Prockop, 2007).

Evidencias procedentes de las MSC derivadas de la médula ósea han confirmado que su influencia paracrina sobre la migración y proliferación de las células endoteliales está acompañada por efectos sobre el reclutamiento específico de macrófagos CD4⁺CD80⁺ durante la cicatrización (Chen *et al*,

2008). De hecho, las MSC también poseen propiedades inmunosupresoras asociadas a la inhibición de la proliferación y función de la mayoría de las poblaciones de células inmunes incluyendo células T, células B, células NK, células T reguladoras y células dendríticas (Shi *et al*, 2011).

Aunque se ha constatado que las ASC secretan citoquinas similares a las de las MSC derivadas de la médula ósea (Kilroy *et al*, 2007), dentro de las que se incluyen las citoquinas con efectos inmunosupresores (Puissant *et al*, 2005), parece ser que su influencia inmunomoduladoras sobre la diferenciación de las células dendríticas humanas es más potente (Ivanova-Todorova *et al*, 2009).

Estudios *in vivo* han corroborado que la administración de ASC en la encefalomiелitis autoinmune experimental crónica no sólo induce la neurogeneración local incrementando el número de progenitores oligodendrocitos endógenos, sino también suprimiendo la respuesta autoinmune mediante el ajuste de la citoquina tipo Th2 secretada por los linfocitos T (Constantin *et al*, 2009). Experimentos *in vitro* también han demostrado que las ASC pueden inhibir la proliferación y la producción de citoquinas inflamatorias por los linfocitos T CD4⁺ y linfocitos T CD8⁺, mientras estimulan la generación de linfocitos T reguladores CD4⁺CD25⁺ capaces de suprimir las respuestas específicas de los linfocitos T ante colágenos asociados al desarrollo de la artritis reumatoide (González-Rey *et al*, 2010). Por otra parte, las ASC son capaces de activar el estado anti-inflamatorio e inducir la secreción de IL10 por los macrófagos porque la infusión sistémica de macrófagos, previamente cultivados en interacción con las ASC o en el medio condicionado derivado del cultivo de las mismas, inhibe la colitis crónica y

protege de la sepsis severa a los ratones experimentales (Anderson *et al*, 2012).

Propiedades Neovasculares.

Los estudios dirigidos a esclarecer la identidad de las ASC también han puesto de manifiesto el papel de estos precursores celulares en la remodelación microvascular mediante su función neovascular. Así, las ASC humanas que han sido aisladas, expandidas en cultivo celular, marcadas con fluorocromos e inyectadas hacia el mesenterio de ratas han evidenciado no sólo un inmunofenotipo perivascular (según la expresión de marcadores de pericitos vasculares: SMA y NG2), sino también han contribuido a incrementar la densidad vascular después de 60 días de su inyección (Amos *et al*, 2008). El potencial neovascular de las ASC también se ha constatado después de su trasplante a los modelos de extremidad isquémica de ratones, donde han inducido el incremento del flujo sanguíneo, la densidad capilar y han contribuido a la recuperación del daño muscular (Moon *et al*, 2006).

Cada vez más estudios confirman la capacidad que tienen las ASC para influir sobre el comportamiento de las células del linaje endotelial. A diferencia del medio condicionado procedente del cultivo de células estromales derivadas de médula ósea humana, el de células estromales adiposas puede estimular la proliferación de las HUVECs aún cuando en ambos medios se detectan citoquinas como el HGF (factor de crecimiento de hepatocitos) e inhibidores de metaloproteinasas 1 y 2 (Verseijden *et al*, 2010). Las interacciones paracrinas que establecen las células precursoras adiposas con las células del linaje endotelial pueden contribuir a la reparación endotelial, pues se ha observado

que al ser inyectadas en la arteria femoral de ratas pueden inhibir la formación neointimal sin llegar a integrarse a la capa endotelial (Takahashi *et al*, 2010). Su influencia angiogénica parece trascender a la del propio tejido adiposo ya que cuando se cocultivan con la fracción de cardiomiocitos (que contiene cardiomiocitos maduros, células endoteliales, células progenitoras) favorecen la formación de estructuras CD31⁺ ramificadas y estables semejantes a vasos (Rubina *et al*, 2009).

Las ASC también pueden proteger a las células endoteliales aórticas humanas de la muerte celular cuando son cultivadas en medio que contiene cycloheximida y TNF α (Moon *et al*, 2006). De hecho, se ha documentado que la secreción del VEGF, HGF y SDF α por las células precursoras adiposas se asocia con su capacidad para contrarrestar la apoptosis y estimular la proliferación de las células endoteliales (Li *et al*, 2006). Incluso, mediante el uso de técnicas de RNA interferencia se ha confirmado que la supresión en más del 80 % de la secreción del HGF conduce a disminuir los efectos positivos que tienen las células precursoras sobre la supervivencia, proliferación y migración de las células endoteliales maduras y progenitoras endoteliales bajo condiciones *in vitro* así como sobre la densidad capilar de los tejidos isquémicos (Cai *et al*, 2007).

Se ha corroborado que las células precursoras adiposas pueden influir sobre las células progenitoras endoteliales secretando VEGF (en respuesta al PDGF-BB secretado por las propias células progenitoras endoteliales) y que interacciones bidireccionales entre ambos tipos celulares disminuyen la apoptosis de las células endoteliales, previniendo la regresión vascular cuando se implantan subcutáneamente en ratones (Traktuev *et al*, 2009).

El condicionamiento paracrina de las células precursoras adiposas sobre la formación de nuevos vasos sanguíneos parece hacerse más evidente bajo condiciones de presiones parciales de oxígeno reducidas (hipoxia). La reducción en la apoptosis y aumento de la proliferación de las células endoteliales incubadas con el medio condicionado procedente de las células precursoras cultivadas bajo hipoxia respecto al de las cultivadas en condiciones de normoxia se ha atribuido en parte a la secreción de citoquinas angiogénicas y antiapoptóticas como el VEGF, HGF y el TGF β , que en el caso del VEGF puede aumentar cinco veces bajo condiciones de hipoxia (Rehman *et al*, 2004). De hecho, la secreción del VEGF se ha hecho progresivamente más alta conforme las ASC se han cultivado bajo 21 %, 5 %, 1 % de oxígeno o se ha incrementado el período de su cultivo bajo hipoxia (Thangarajah *et al*, 2009). Se piensa que estímulos externos como la hipoxia podrían activar los receptores tirosinas quinasa regulados por señales extracelulares (ERK) y a los miembros de la vía de señalización Akt, conduciendo finalmente a la estabilización del HIF1 α implicado en la expresión del VEGF por las células precursoras adiposas (Song *et al*, 2010).

La presencia de otras citoquinas en el medio condicionado derivado del cultivo de células precursoras adiposas, como la angiopoyetina-1, se ha asociado con la capacidad de éstas células para estimular la migración de las células endoteliales en ensayos de quimiotaxis (Takahashi *et al*, 2010); mientras que la secreción de otras, como el factor de crecimiento semejante a insulina-1 y el factor neurotrófico derivado de cerebro, le ha conferido a las células precursoras adiposas efectos protectores ante el daño celular inducido por la

isquemia en ratas neonatales tratadas con su medio condicionado (Wei *et al*, 2009).

Si bien el medio condicionado procedente de las ASC cultivadas bajo hipoxia puede estimular 1,7 veces más la formación de estructuras semejantes a capilares (Rubina *et al*, 2009), su cocultivo con células endoteliales bajo condiciones de hipoxia también potencia la formación de túbulos debido probablemente al reforzamiento de las interacciones cooperativas que tiene lugar entre los dos tipos celulares bajo condiciones hipóxicas (Rubina *et al*, 2009). En efecto, la generación de redes vasculares estables por tres semanas en cocultivo con células endoteliales parece estar asociada no solamente a las interacciones paracrinas, sino también al aumento en la producción de proteínas de matriz extracelular por ambos tipos celulares así como al incremento en la presentación superficial de CD31/PECAM1 en las células endoteliales y en la expresión de actina de músculo liso- α en las propias células precursoras adiposas (Merfeld-Clauss *et al*, 2010).

La contribución directa de las ASC a la formación de nuevos vasos sanguíneos se ha puesto de manifiesto en experimentos *in vitro* donde se ha observado que pueden incrementar su migración en respuesta al PDGF-BB (Amos *et al*, 2008) y formar estructuras ramificadas semejantes a túbulos que coexpresan CD34 y CD31 después de diez días en medio metilcelulosa (Madonna y De Caterina, 2008). También se ha revelado que células CD31⁻/CD34⁻/CD106⁻/VCAM1⁻ y células Flk1⁺, capaces de diferenciarse hacia células de los linajes osteogénicos y adipogénicos, evidencian características de células progenitoras endoteliales ya que cuando son estimuladas *in vitro* con VEGF expresan marcadores endoteliales y bajo condiciones *in vivo*, asociadas al

modelo isquémico de extremidades de ratón, responden diferenciándose hacia células endoteliales (Cao *et al*, 2005). Otra subpoblación de células estromales adiposas CD31⁺/CD34⁺/Flk1⁺ también ha evidenciado capacidad para diferenciarse hacia un fenotipo de células endoteliales bajo condiciones *in vitro*, y al ser trasplantadas hacia ratones incrementa el flujo sanguíneo y la densidad capilar en la extremidad isquémica (Moon *et al*, 2006).

Las Células Mesenquimales Multipotenciales Derivadas del Tejido Adiposo Acoplan su Función Neovascular con la Adipogénica.

Si bien existen resultados que sugieren la baja capacidad de las células estromales adiposas para diferenciarse hacia células endoteliales (Takahashi *et al*, 2010), cada vez más evidencias indican que además de diferenciarse hacia el linaje adipogénico también pueden hacerlo hacia el linaje endotelial. A pesar de que las células precursoras adiposas recién aisladas evidencian hipometilación en sus promotores adipogénicos (Noer *et al*, 2006) e hipermetilación en las regiones promotoras de genes específicos del linaje endotelial (Boquest *et al*, 2007), experimentos *in vitro* han confirmado que su diferenciación hacia células endoteliales o hacia células semejantes a adipocitos depende del medio usado (Balwierz *et al*, 2008). Según éste estudio, células de la fracción vascular estromal derivadas del tejido adiposo subcutáneo incubadas durante 24 horas en medio angiogénico incrementan la expresión de genes característicos de células endoteliales (eNOS, vWF, Jagged, CXCR4, CXCR12 y Notch4) y disminuyen la de genes adipogénicos; mientras que las células cultivadas en medio adipogénico evidencian un patrón de expresión génica contraria, sobreexpresando genes adipogénicos como PPAR γ 1, PPAR γ 2, C/EBP α , ap2, leptina, LPL, CD36.

Otros estudios *in vitro* indican que los adipocitos y las células endoteliales tienen un progenitor común ya que, por una parte, se ha confirmado que los adipocitos humanos maduros desdiferenciados tienen el potencial para adquirir el fenotipo endotelial *in vitro* y promover tanto la formación de estructuras vasculares en matrigel como la neovascularización en un modelo de tejido isquémico de ratón (Planat-Benard *et al*, 2004); y por otra parte, se ha constatado que las células endoteliales maduras CD31⁺ purificadas desde la fracción vascular estromal adiposa también se convierten hacia adipocitos después de 21 días bajo condiciones de cultivo adipogénicas (Wosnitza *et al*, 2007).

De hecho, se ha identificado una población celular dentro de la SVF del tejido adiposo humano CD34⁺CD31⁻ que evidencia características de células progenitoras endoteliales debido a su capacidad para incrementar la neovascularización mediante la incorporación directa hacia la extremidad isquémica de ratón (Miranville *et al*, 2004). Interesantemente, cuando las células CD34⁺ CD90⁺ se cultivan en medio adipogénico se diferencian hacia adipocitos y cuando se cultivan en medio endotelial se diferencian hacia células endoteliales (CD31⁺VEGF⁺Flk1⁺), generando estructuras semejantes a capilares y produciendo niveles elevados del VEGF (De Francesco *et al*, 2009). A su vez, en otro estudio independiente donde la SVF adiposa fue separada en cuatro poblaciones celulares, se confirmó que la población CD34⁺CD31⁻CD90⁺ presentó el mayor potencial adipogénico (Han *et al*, 2011).

Desde hace varias décadas se ha corroborado que las células 3T3 que se diferencian hacia adipocitos secretan factores que estimulan la neovascularización *in vivo* y la migración *in vitro* de células aórticas y capilares

en una proporción dependiente al grado de diferenciación alcanzado (Castellot *et al*, 1982). También se ha constatado que las células endoteliales cultivadas sobre geles de colágeno que contienen células 3T3-L1, o su medio condicionado, invaden la matriz subyacente para formar una red de túbulos interconectadas (Montesano *et al*, 1993). Experimentos *in vivo* en modelos de ratón atímico han revelado que los preadipocitos 3T3-F442A implantados subcutáneamente no sólo generan almohadillas grasas, sino que también incrementan la expresión de marcadores de células endoteliales así como la vascularización de las almohadillas durante los 14-21 días siguientes a la implantación (Bouloumié *et al*, 2002). El desarrollo de modelos *ex vivo* de tejido adiposo intacto ha permitido corroborar que la interrelación espacial y temporal entre la formación de vasos sanguíneos y la adipogénesis está asociada a la generación de agrupamientos adipogénicos/angiogénicos que incluyen células CD34⁺/CD68⁺ (Nishimura *et al*, 2007).

El potencial angiogénico que tienen los preadipocitos para inducir y sostener la neovascularización durante su diferenciación adipogénica ha sido atribuido a la expresión de citoquinas como el VEGF (Fukumura *et al*, 2003), FGFb (Borges *et al*, 2006), que favorecen la proliferación y migración de las células endoteliales (Borges *et al*, 2007), así como a la secreción del HGF que estimula la migración de las células progenitoras endoteliales (Bell *et al*, 2008). Además, el incremento de la secreción del VEGF hacia el medio adipogénico donde se cultivaron las ASC se ha vinculado a los efectos favorables de dicho medio sobre el número de células endoteliales cultivadas en el mismo (Verseijden *et al*, 2009).

Al parecer, los miembros de la familia de receptores nucleares PPAR están involucrados en la activación génica durante la expresión VEGF pues en modelos de cocultivo de células endoteliales/intersticiales se ha corroborado que la activación farmacológica de PPAR α y PPAR γ conduce a la formación de túbulos endoteliales a través de un mecanismo dependiente del VEGF (Biscetti *et al*, 2008). Quizás por ello se ha observado que la inhibición de la diferenciación adipogénica, también dependiente del PPAR γ , en los preadipocitos murinos implantados aborta no sólo la formación del tejido adiposo sino también la formación de nuevos vasos sanguíneos (Fukumura *et al*, 2003).

Experimentos a nivel de organismo han constatado que la masa de tejido adiposo puede ser regulada mediante la vasculatura, pues el tratamiento con agentes anti-angiogénicos conduce a la pérdida del tejido adiposo y reducción del peso de forma reversible y dosidependiente (Rupnick *et al*, 2002). Interesantemente, la inhibición de la angiogénesis por anticuerpos que bloquean al VEGFR2 en el modelo *in vivo* de cámara en la piel dorsal de ratón (Fukumura *et al*, 2003) o por la administración subcutánea de anticuerpos monoclonales anti-VEGF en ratones a partir de los cuales se desarrolla un modelo *ex vivo* de tejido adiposo intacto (Nishimura *et al*, 2007) reduce la angiogénesis y la diferenciación de los preadipocitos. Parece ser que éste fenómeno depende de un mecanismo que incluye la interrupción de la señalización VEGF-VEGFR2 en las células endoteliales (Fukumura *et al*, 2003) y el bloqueo de las interacciones que probablemente tienen lugar entre los vasos sanguíneos, las células CD34⁺/CD68⁺ y los preadipocitos (Nishimura *et al*, 2007). En efecto, el cocultivo de células endoteliales HUVECs con

preadipocitos 3T3-L1 ha confirmado que la potenciación mediada por las células endoteliales sobre la diferenciación adipogénica de los preadipocitos requiere la activación previa del VEGFR2 en las células HUVECs (Lai *et al*, 2009).

Aunque se desconoce el mecanismo por el que las células endoteliales podrían ejercer sus efectos potenciadores de la diferenciación en un contexto adipogénico, estudios anteriores han corroborado la influencia que ejercen las células endoteliales sobre el comportamiento de los preadipocitos. Desde los años noventa se ha constatado que el medio condicionado derivado del cultivo de células endoteliales estimula la proliferación de los preadipocitos (Lau *et al*, 1990), sin que existan diferencias entre los efectos proliferativos ejercidos por las células endoteliales microvasculares derivadas del tejido adiposo omental y subcutáneo (Hutley *et al*, 2001). También se ha corroborado que las células endoteliales microvasculares liberan componentes de la matriz extracelular que promueven la diferenciación de los preadipocitos (Varzaneh *et al*, 1994), pero que a su vez biomoléculas como la endotelina-1 inhiben de una manera dosidependiente el almacenamiento de lípidos así como la expresión de la enzima lipogénica glicerol-3-fosfato deshidrogenasa durante la diferenciación adipogénica de las células precursoras humanas (Hauner *et al*, 1994).

La influencia dual, tanto inhibitoria como estimuladora, de las células endoteliales sobre la adipogénesis de las células precursoras sugiere que las células endoteliales pudieran ejercer una función moduladora dependiente de contexto sobre las células precursoras durante los períodos de balance energético positivos/negativos del organismo. De hecho, se ha observado que la disminución significativa en la diferenciación adipogénica de las células

estromales adiposas cocultivadas con células endoteliales está acompañada por el incremento de la expresión de factores involucrados en la señalización Wnt, especialmente del ligando Wnt1 (Rajashekhar *et al*, 2008), que es reconocida ampliamente por su implicación en la especificación de linajes. Quizás por ello las células endoteliales bajo condiciones de hipoxia liberan citoquinas, distintas al VEGF, que sostienen la viabilidad de los preadipocitos (Frye *et al*, 2005) u otras como el SDF1 que estimula la quimiotaxis y diferenciación de las células CD34⁺/CD31⁻ derivadas del tejido adiposo humano hacia el linaje endotelial, contribuyendo de éste modo al desarrollo de la red vascular durante la expansión tisular adiposa (Sengenès *et al*, 2007).

Cada vez más evidencias corroboran que la función del endotelio va más allá de representar una barrera permeable entre la sangre y los órganos, pues también actúa como un regulador maestro del crecimiento y desarrollo de los órganos (Tirziu y Simons, 2009). Además, ha sido ampliamente reconocido que, debido a la propiedad del tejido adiposo de crecer durante la mayor parte de la vida adulta, la microcirculación tisular adiposa es única dentro del sistema vascular (Crandall *et al*, 1997), llegando a ser lo suficientemente extensa como para que cada adipocito sea rodeado por uno o más capilares (Lijnen, 2008). Estudios de microscopía electrónica *in vivo* han corroborado que la diferenciación capilar concurre durante los estados tempranos de adipogénesis en los preadipocitos perivascuales (Hausman y Richardson, 2004), pues parece ser que la angiogénesis es necesaria para contrarrestar la hipoxia surgida como resultado de la expansión tisular adiposa (Rutkoski *et al*, 2009). De éste modo, la neovascularización y la adipogénesis son actualmente reconocidos como procesos acoplados espacial y temporalmente durante toda

la vida del organismo (Cao, 2007) y cuya coordinación garantiza la plasticidad del tejido adiposo o propiedad de éste tejido para evidenciar expansión y regresión durante la vida adulta según el balance energético del organismo (Christiaens y Lijnen, 2010).

3-Determinación, Diferenciación Adipogénica y Celularidad Adiposa.

Determinación Adipogénica.

Antes que las células adquieran sus características especializadas mediante la diferenciación, tienen que comprometerse con cierta vía de diferenciación y destino celular a través de la determinación celular (Alberts *et al*, 2004). Sólo recientemente se ha comenzado a dilucidar algunos de los factores implicados en la determinación celular adipogénica. Así, se ha identificado a la proteína dedos de zinc Zfp 423 como un regulador transcripcional de la determinación hacia preadipocitos (Gupta *et al*, 2010). La aplicación de técnicas inmunohistoquímicas para la expresión de GFP conducida por Zfp 423 *in vivo* ha confirmado su relevancia para la determinación hacia preadipocitos y el origen perivascular de los mismos (Gupta *et al*, 2012).

Otras proteínas dedos de zinc parecen estar involucradas en el compromiso de las MSC hacia los linajes mesenquimáticos. Se ha demostrado que Zfp 521 actúa como un regulador clave del compromiso y diferenciación adipogénica inhibiendo la expresión de Zfp 423 y favoreciendo la conversión hacia el linaje osteogénico (Kang *et al*, 2012), como también se ha demostrado para Zfp 467 mediante la aplicación de técnicas de RNA interferencia (You *et al*, 2012).

Aunque estudios puntuales han documentado los efectos activadores del micro RNA-143 (Esan *et al*, 2004) e inhibitorios del micro RNA-27 (Lin *et al*, 2009) y

micro RNA-138 (McGregor y Choi, 2011) sobre los propios factores de transcripción adipogénicos, la descripción de perfiles moleculares han permitido vincular a los micro RNAs con la determinación celular mesenquimal porque han revelado 18 micro RNAs que podrían promover la adipogénesis reprimiendo la señalización WNT y otros 29 micro RNAs que parecen tener el efecto contrario (Qin *et al*, 2010). Múltiples evidencias indican que la señalización WNT tiene un papel destacado en controlar la adipogénesis; como por ejemplo, WNT 10B que mantiene a los preadipocitos en un estado indiferenciado a través de la inhibición de factores de transcripción adipogénicos (Laudes, 2011).

Diferenciación Adipogénica.

Una vez que las células precursoras se han comprometido con el programa adipogénico, ante señales específicas se activa una cascada transcripcional que conduce al estado de diferenciación terminal asociado con la expresión de genes metabólicos (FABP4, Glut4) y adipoquinas (leptina y adiponectina) característicos del adipocito (Cristancho y Lazar, 2011). Ha quedado establecido que el control transcripcional de la adipogénesis incluye la activación secuencial de los C/EBPs y PPAR γ ; donde la función fundamental de C/EBP β y δ es inducir la expresión del PPAR γ mediante la unión de los C/EBPs a sitios del promotor PPAR γ , cuyo gen es responsable de inducir a C/EBP α y del establecimiento de un lazo de retroalimentación positiva dentro de la cascada en la que la expresión de PPAR γ y C/EBP α se refuerzan mutuamente, garantizando el mantenimiento del estado diferenciado (Rosen y Spiegelman, 2000).

De éste modo, PPAR γ no solamente es crucial para la adipogénesis sino también es requerido para el mantenimiento del estado diferenciado; mientras que C/EBP α es necesario para la adquisición de la sensibilidad a la insulina, pero no para la acumulación de lípidos (Rosen y MacDougald, 2006). Estudios genómicos de los adipocitos maduros han confirmado que PPAR γ y C/EBP α están presentes en el 60 % de todos los genes inducidos durante la diferenciación terminal (Cristancho y Lazar, 2011).

Aunque experimentos *in vitro* han comprobado que los preadipocitos derivados del tejido adiposo humano pueden no requerir de la división celular para entrar en la diferenciación adipogénica (Entenmann y Hauner, 1996), actualmente se reconoce que la expansión clonar es un requisito para la subsecuente diferenciación (Farmer, 2006). Se piensa que la adipogénesis requiere dos rondas de divisiones celulares para reorganizar la cromatina facilitando la inducción de genes adipogénicos o debido a que componentes de la maquinaria del ciclo celular son necesarios para la expresión de genes adipogénicos (Farmer, 2006).

Celularidad Adiposa.

Ha quedado establecido que la proliferación y diferenciación adipogénica asociada a la expansión acelerada del tejido adiposo humano presenta uno de sus valores máximos después del nacimiento, seguido por otro menor antes de la pubertad, entre los nueve y los 13 años de edad (Frühbeck, 2008). Sobrepasada estas etapas, se estima que la tasa media anual de recambio de adipocitos es de $8,4 \pm 6,2$ % y que la mitad de los adipocitos son reemplazados cada 8,3 años (Kirsty *et al*, 2008).

En el caso particular del tejido adiposo parece ser que sus células precursoras no sólo garantizan la renovación celular y el reemplazamiento de las células diferenciadas que han concluido su ciclo de vida, sino que además participan directamente en la función tisular adiposa al ser reclutados durante períodos de balances energéticos positivos del organismo. De hecho, es ampliamente reconocido que la expansión del tejido adiposo es resultado tanto del incremento del tamaño de los adipocitos (hipertrofia) como del aumento del número de adipocitos debido al reclutamiento de células precursoras (hiperplasia). Esta propiedad lo convierte en el único tejido capaz de cambiar su masa en varios órdenes de magnitud durante la etapa adulta, pudiendo variar desde 2-3 % del peso corporal en atletas de élite hasta el 60-70 % del peso corporal en sujetos obesos masivamente (Hausman *et al*, 2001). Así, un hombre normopeso de 70 kilogramos de peso corporal tendría unos 15 kilogramos de tejido adiposo; mientras que uno obeso de 140 kilogramos habría aumentado su tejido adiposo hasta los 80 kilogramos (Nelson y Cox, 2009).

Debido en parte a la capacidad que tienen los adipocitos de variar en tamaño desde 20 micrómetros a 200 micrómetros de diámetros con volúmenes que van desde unos picolitros a aproximadamente 3 nanolitros, se estima que 1 gramo de tejido adiposo contiene aproximadamente 800 miligramos de triacilglicerol y 100 miligramos de agua, (Frühbeck, 2008). Sin embargo, estudios morfológicos del tejido adiposo durante los períodos de incremento y bajada de peso corporal inducido por la dieta han sugerido que, una vez alcanzado el tamaño medio del adipocito, se activan eventos que favorecen el incremento del número de adipocitos ya que los animales que retornan a sus pesos normales

mediante una dieta de adelgazamiento lo hacen disminuyendo el tamaño medio de sus adipocitos y manteniendo el número de adipocitos alcanzado durante el período de ganancia de peso (Faust *et al*, 1978). La aplicación de técnicas radioautográficas ha permitido demostrar que el incremento del número de adipocitos en la grasa epididimal y retroperitoneal de ratas alimentadas con dietas de alto contenido de azúcares y lípidos es resultado de la proleferación y diferenciación de los precursores de adipocitos (Miller *et al*, 1984).

Parece ser que los adipocitos hipertrofiados secretan citoquinas que inducen la proliferación de los preadipocitos, pues se ha encontrado una correlación positiva entre la gama de tamaños de adipocitos de los tejidos inguinales y epididimales de ratas obesas y la capacidad de su medio condicionado para estimular la proliferación de los preadipocitos (Marques *et al*, 1998). La aplicación de un sistema de cultivo en cámaras de gradiente, que facilitó compartimentar células 3T3-L1 según su grado de diferenciación, ha permitido corroborar que los adipocitos maduros y de mayor tamaño secretan citoquinas mediante las que activan la adipogénesis de los preadipocitos vecinos (Lai *et al*, 2012). Mientras que estudios *in vivo* en modelos de ratón ob/ob han confirmado que la tasa de proliferación se incrementa significativamente hasta un 4.8 % (Rigamonti *et al*, 2011). Se estima que la formación de nuevos adipocitos humanos desde los precursores tiene lugar una vez que los adipocitos alcanzan la capacidad máxima de hipertrofia de unos 1000 picolitros (Frühbeck, 2008). De éste modo, ha quedado aceptado que tanto la hipertrofia del adipocito como la hiperplasia ocurre en asociación con el balance energético positivo durante el crecimiento normal y el desarrollo de la obesidad,

con la hipertrofia precediendo cíclicamente a la hiperplasia (Hausman *et al*, 2001).

Si bien se ha demostrado que la ganancia aproximada de 1,6 kilogramos de tejido adiposo subcutáneo de la región inferior del cuerpo de jóvenes normopesos conduce a la generación de 2,6 billones de nuevos adipocitos en ocho semanas, también se han constatado diferencias regionales en los mecanismos celulares asociados al incremento de la masa adiposa durante la sobrealimentación (Tchoukalova *et al*, 2010). En efecto, los sujetos emparejados por su índice de masa corporal pueden diferir considerablemente respecto a la distribución de su grasa corporal (Thomou *et al*, 2010). En general, el tejido adiposo está distribuido en múltiples depósitos en el cuerpo y los adipocitos no sólo se distribuyen subcutáneamente e internamente sino también adyacentes o embebidos en nódulos linfáticos y músculo esquelético (Trayhurn, 2007). Aproximadamente el 80 % de toda la grasa corporal está en el área subcutánea, fundamentalmente en la región del fémur, glúteos y en la pared abdominal anterior y posterior; mientras que la grasa visceral representa entre el 10-28 % de la grasa total en los hombres y el 5-8 % en las mujeres premenopaúsica, pero suele incrementar durante el envejecimiento en ambos sexos (Ibrahim, 2009). La grasa subcutánea, que no está limitada por restricciones anatómicas, puede expandirse hacia el exterior, tiende a crecer por el incremento del número de células adiposas y su función de almacenamiento energético es más a largo plazo, asociada al embarazo; mientras que la grasa visceral, más restringida anatómicamente, suele expandirse más por el aumento del tamaño de sus células adiposas, cuya

función de almacenamiento lipídico es más a corto plazo, y se ha vinculado a las actividades de caza durante la evolución humana (Thomou *et al*, 2010).

Teniendo en cuenta que el tamaño de un órgano depende del número y volumen de las células que contiene así como de la cantidad de fluido y matriz extracelular (Conlon y Raff, 1999), considerando que en el tejido adiposo la matriz extracelular se limita a la lámina basal que rodea al adipocito (Ross y Pawlina, 2006), entonces podría pensarse que la masa tisular adiposa es en última instancia resultado del número y tamaño de sus células adiposas. Por consiguiente, los condicionantes implicados en las variaciones regionales de la expansión adiposa deben ejercer sus efectos influyendo tanto en el tamaño como en la tasa de supervivencia y proliferación celular.

La aplicación de técnicas de formación de colonias (en los que cada colonia fue derivada de una única célula precursora) ha permitido demostrar durante los años ochenta que las células perirrenales derivadas del tejido adiposo de ratas se replican más rápidamente, independientemente de la edad del animal, que los precursores epididimales (Djian *et al*, 1983). Esta variabilidad dependiente de los subtipos poblacionales inherentes a cada depósito, y no tanto a influencias extrínsecas al tejido, también se ha visto confirmada en la grasa omental humana cuando se clonaron dos subtipos de preadipocitos que se distinguieron por su velocidad de proliferación (Kirkland *et al*, 1993). Además, el índice apoptótico de los preadipocitos omentales cultivados en ausencia de suero y bajo los efectos del TNF α fue mayor que el de los preadipocitos derivados de los depósitos subcutáneo (Niesler *et al*, 1998). El análisis de colonias derivadas una sola célula ha confirmado que la proporción de células diferenciadas, la acumulación de lípidos, la actividad de la glicerol-3-fosfato

deshidrogenasa, la abundancia de FABP4 así como los niveles de expresión de PPAR γ y C/EBP α son superiores en los preadipocitos subcutáneos, intermedios en los mesentéricos e inferiores en los omentales (Tchkonia *et al*, 2002).

Estudios desarrollados en la última década han dejado finalmente establecido que en las colonias surgidas de un solo preadipocitos pueden encontrarse dos subtipos de preadipocitos interconvertibles, cuya abundancia relativa varía entre los tejidos adiposo subcutáneo, mesentérico y omentales; que se distinguen por sus susceptibilidad a la apoptosis, velocidad de proliferación y potencial adipogénico según los niveles de expresión de factores de transcripción y proteínas asociadas al linaje adipogénico (Tchkonia *et al*, 2005). Consecuentemente a sus diferencias en las tasas de proliferación, también se ha corroborado que los preadipocitos omentales, de proliferación más lenta que los subcutáneos y mesentéricos, presentan los telómeros más largos (Tchokonia *et al*, 2006).

La mayor capacidad de diferenciación adipogénica, mayor resistencia a la apoptosis y velocidad de proliferación de los preadipocitos subcutáneos respecto a los restantes, y de los mesentéricos respecto a los omentales parecen estar reforzados por mecanismos genéticos ya que se han identificado 96 genes del desarrollo, incluyendo genes homeóticos asociados a la identidad posicional de estructuras anatómicas, que se expresan diferencialmente entre los preadipocitos derivados de los respectivos depósitos (Tchkonia *et al*, 2007) y que podrían contribuir a que el tamaño y el número celular durante la expansión tisular adiposa cambie dependiendo de la dieta, la genética así como de su interacción según describen los modelos matemáticos sobre

dinámica de crecimiento del tejido adiposo (Jo *et al*, 2009). De hecho, la ejecución de un ensayo de expresión génica global sobre microRNAs en muestras de tejido adiposo omental y subcutáneo ha revelado que 16 miRNAs muestran un patrón de expresión específico de depósito que podría contribuir a diferencias intrínsecas entre los mismos, pues los niveles de expresión de algunos de ellos (miRNA: 132; 99a; 134; 181a; 145; 197) se correlacionan tanto con variables metabólicas relevantes (adiponectina y leptina circulante, glucosa plasmática en ayunas) como con características morfológicas (Klötting *et al*, 2009).

Como bien se ha confirmado a través del análisis bioquímico de moléculas que participan tanto en la lipogénesis como en la lipólisis, las diferencias en las características intrínsecas de los preadipocitos pueden tener repercusiones en las características inherentes a los adipocitos de los diferentes depósitos adiposos (Caserta *et al*, 2001; Dicker *et al*, 2007; Samulin *et al*, 2008), probablemente contribuyendo también a que los adipocitos del tejido adiposo visceral sean más sensibles a la lipólisis, menos ávidos en la absorción de ácidos grasos libres y triglicéridos que los del tejido adiposo subcutáneo (Ibrahim, 2009).

Aunque los adipocitos podrían representar el 25 % de la población celular total de un adulto (Frühbeck, 2008) y los preadipocitos el 15-50 % de las células del tejido adiposo (Thomou *et al*, 2010), existen otros tipos celulares (fibroblastos, pericitos, macrófagos, células endoteliales, mesoteliales y sanguíneas) localizadas en la fracción vascular estromal adiposa (Frühbeck, 2008). Dichas células, junto con las diferencias en los niveles de irrigación e inervación entre los depósitos, podrían contribuir a la heterogeneidad funcional del tejido

adiposo de todo el organismo (Lee y Fried, 2010), y cuya totalidad de depósitos anatómicos discretos se ha definido como órgano adiposo (Hausman *et al*, 2001; Lee y Fried, 2010). De éste modo, se ha propuesto que la respuesta proliferativa de los preadipocitos también pueda estar modulada por influencias paracrinas, endocrinas y neurales (Hausman *et al*, 2001). Se ha comprobado que el tejido adiposo visceral no sólo está más vascularizado e innervado que el subcutáneo (Ibrahim, 2009), sino que también difieren en sus perfiles proteómicos (Peinado *et al*, 2010) y de secreción de proteínas angiogénicas implicadas seguramente en la mayor hipertrofia del tejido adiposo visceral (Hocking *et al*, 2010).

4-Condicionantes Tisulares Asociados a la Disfunción Tisular Adiposa: estrés oxidativo, hipoxia e inflamación.

La generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) es una condición inherente a los organismos aeróbicos. De hecho, el 1 % del oxígeno consumido por los humanos se reduce convirtiéndose en especies reactivas del oxígeno (Baynes, 2011). Junto con las especies reactivas del nitrógeno (RNS), las del oxígeno forman parte del sistema redox celular implicado en la modificaciones oxidativas de lípidos, proteínas y DNA, que son relevantes durante los mecanismos de diferenciación, maduración y tráfico de vesículas intracelulares (Trachoothan *et al*, 2008). Así, se han constatado incrementos notables en la producción de ROS durante la diferenciación de células 3T3-L1 hacia adipocitos (Furukawa *et al*, 2004), que al parecer podrían acelerar el proceso de diferenciación adipogénica e inducir la expansión clonal mitótica mediante la activación del factor transcripcional C/EBP β (Lee *et al*, 2009). Además, la incubación de adipocitos 3T3-L1 con ácidos oleico, linoleico y araquidónico

induce la producción de ROS (Furukawa *et al*, 2004) y las ROS/RNS actúan como segundos mensajeros asociados a la señalización de la insulina, inactivando reversiblemente algunas proteínas fosfatasa mientras que el receptor de insulina activa las proteínas tirosinas quinasas de la vía (Bashan *et al*, 2009; Baynes, 2011).

Si bien las ROS/RNS pueden estar implicadas en el funcionamiento celular normal, también es reconocido que un incremento en la producción de ROS o una disminución en la capacidad de desecharlas, debido a estímulos exógenos o alteraciones metabólicas endógenas, puede interrumpir la homeostasis redox celular (Trachoothan *et al*, 2008) y generar el estado de estrés oxidativo con el consecuente incremento en el daño oxidativo a las biomoléculas (Baynes, 2011).

Cada vez más evidencias revelan que los estados de resistencia a la insulina asociados a la obesidad están vinculados estrechamente con el incremento del estrés oxidativo debido tanto al incremento de la producción de ROS como a la disminución de la capacidad antioxidante (Bashan *et al*, 2009). La mayoría de los estudios en humanos sobre estrés oxidativo en la obesidad han sido de sección transversal, y se han desarrollado usando muestras de plasma, suero y eritrocitos debido a su manejo más fácil (Vincent and Taylor, 2006). Como las ROS/RNS son de vida corta y difíciles de medir (Bashan *et al*, 2009), la cuantificación del estrés oxidativo en la obesidad se ha efectuado indirectamente, evaluando biomarcadores como TBARS (sustancia ácida reactiva tiobarbitúrica), MDA (malondialdehído), isoprostanos F2, isoprostanos-8, 4-HNE (4-hidroxinenal), PEROX (hidroperóxidos lipídicos) (Vincent and Taylor, 2006).

Ha quedado demostrado que el incremento del estrés oxidativo sistémico asociado a la obesidad no tiene su origen en el tejido hepático, renal, muscular esquelético ni en la aorta, sino en el tejido adiposo y que es debido tanto a la activación de la vía NADPH oxidasa (Furukawa *et al*, 2004) como a la afectación del sistema de defensa antioxidante y en particular de la Glutathion Peroxidasa (Furukawa *et al*, 2004; Lee *et al*, 2008). Junto con la activación de las oxidasas de ácidos grasos, dentro de las que se encuentra la vía NADPH oxidasa, las reacciones secundarias del transporte de electrones mitocondrial son reconocidas también como otros de los mecanismos *in vivo* implicados en la generación de ROS (Baynes, 2011). Su activación puede tener lugar por la hipoxia o disminución de las presiones parciales de oxígeno por debajo de las necesidades celulares (Carrière *et al*, 2004), en una reacción en la que se oxida el radical semiquinona y se forman radicales superóxidos (Baynes, 2011).

Parece probable que la activación de las reacciones secundarias del transporte de electrones mitocondrial es relativamente frecuente durante la obesidad ya que la expansión del tejido adiposo presupone la formación de áreas tisulares hipóxicas (Regazzetti *et al*, 2009). De hecho, se ha demostrado que el tejido adiposo de ratones obesos es hipóxico (Hosagai *et al*, 2007) y se estima que el volumen alcanzado por los adipocitos hipertrofiados en los sujetos obesos puede exceder la distancia media (100-200 μm) de difusión del oxígeno gaseoso (Trayhurn *et al*, 2008) así como que la expresión del HIF1 α en las células precursoras CD34⁺CD31⁻ está correlacionado positivamente con el BMI de los pacientes (Mamus *et al*, 2008).

Independientemente de los efectos de la hipoxia sobre el funcionamiento del tejido adiposo asociados a la generación de especies reactivas del oxígeno, se

piensa que la hipoxia por sí misma podría ser una causa subyacente de resistencia a la insulina (Wood *et al*, 2009), pues se ha corroborado que tanto en adipocitos humanos como en murinos puede inhibir la señalización de la insulina por un mecanismo dependiente de la expresión del factor de transcripción HIF (Regazzetti *et al*, 2009). También puede desregular la producción de adiponectina y adipoquinas relevantes para la función tisular adiposa (Hosagai *et al*, 2007) así como inducir las respuestas inflamatorias en los diferentes tipos celulares presentes en el tejido adiposo (Wood *et al*, 2009), mediante la secreción de citoquinas como la IL-6, angiopoyetina-4, factor inhibitorio de migración de macrófagos (Trayhurn *et al*, 2008). Por otra parte, experimentos *in vivo* han corroborado que la hipoxia intermitente causa resistencia a la insulina en ratones delgados (Liyori *et al*, 2007).

Junto con el estrés oxidativo y la hipoxia que acompañan a los períodos de balance energético positivo, la inflamación, definida como la acumulación de leucocitos no solamente en los focos de infección sino también en los tejidos dañados (Abbas *et al*, 2009), es otra de las condiciones tisulares asociadas a la obesidad. De hecho, el estado de inflamación no asociado a patógenos es uno de los fenómenos biológicos que más contribuye a las enfermedades crónicas en las sociedades industrializadas (Nathan and Ding, 2010). Dentro de las cuales también se incluye la resistencia a la insulina asociada a la obesidad, debido a que se han encontrado evidencias de infiltración significativa hacia el tejido adiposo de macrófagos (Weisberg *et al*, 2003; Hu *et al*, 2003), linfocitos T (Wu *et al*, 2007; Rausch *et al*, 2008) y eosinófilos (Wu *et al*, 2011).

La aplicación de técnicas de citometría de flujo ha permitido estimar la presencia de 4042 ± 440 macrófagos por gramo de tejido adiposo, pudiendo

llegar a representar el $8,8 \pm 1,1$ % (Clément *et al*, 2004) y el 11 % de la fracción vascular estromal (Curat *et al*, 2004). Aproximadamente el 90 % de todos los macrófagos del tejido adiposo de sujetos obesos está localizado en los sitios de muerte necrótica de los adipocitos (Harford *et al*, 2011) y una pérdida drástica de peso puede conducir a una disminución significativa en el número de macrófagos y al mejoramiento del perfil inflamatorio de los pacientes (Cancello *et al*, 2005). Los adipocitos parecen contribuir a la infiltración de los macrófagos hacia el tejido adiposo ya que se ha corroborado que la incubación de las células endoteliales derivadas del tejido adiposo con medio condicionado de adipocitos conduce a una sobreexpresión de moléculas de adhesión de células endoteliales e incremento de la quimiotaxis de los monocitos sanguíneos (Curat *et al*, 2004). Sin embargo, experimentos en modelos de ratones obesos alimentados con dieta de alto contenido graso han corroborado que la infiltración de linfocitos T hacia el tejido adiposo precede a la acumulación de macrófagos (Kintscher *et al*, 2008; Nishimura *et al*, 2009).

Se piensa que los linfocitos T CD4⁺ (Kintscher *et al*, 2008) y linfocitos T CD8⁺ (Nishimura *et al*, 2009) promueven el reclutamiento y la activación de los macrófagos en el tejido adiposo. Interesantemente, los macrófagos reclutados hacia el tejido adiposo durante los períodos de balance energético positivo representan una subclase de macrófagos con propiedades diferentes a los que residen en el tejido, caracterizados por sobreexpresión de genes que codifican para IL-6, sintasa inducible óxido nítrico (iNOS) y receptor 2 de quimioquina CC (CCR2) (Lumeng *et al*, 2007). Mientras que los macrófagos detectados en el tejido adiposo subcutáneo de pacientes sometidos a pérdida drástica de peso fueron marcados positivamente para la proteína anti-inflamatoria IL-10

(Cancello *et al*, 2005). Evidencias reveladas a partir de experimentos *in vitro* han permitido confirmar que los macrófagos pueden ajustar reversiblemente su fenotipo funcional asociado a la expresión de CD163 y CD206 (Porcheray *et al*, 2005), según la composición de citoquinas (IFN- γ , IL-12, IL-4, IL-10), la combinación de citoquinas y otros estímulos activadores como los lipopolisacárido (Mosser and Edwards, 2008).

Actualmente los macrófagos se clasifican en dos grandes grupos que se diferencian en la composición de las moléculas presentes en su superficie celular, los estímulos que los activan y en su comportamiento pro-inflamatorio y anti-inflamatorio (Rees, 2010). Los macrófagos clásicos (M1) son estimulados por IFN γ sólo o en combinación con lipopolisacáridos, produciendo citoquinas inflamatorias (IL-1, IL-6, TNF α), especies reactivas de oxígeno e induciendo respuesta de células T Th1; los macrófagos activados alternativamente (M2) son inducidos por IL-4, IL-13, producen IL-10, TGF β y receptor antagonista de IL-1 (IL-1Ra), dirigidas a disminuir la respuesta inflamatoria y promover la respuesta de células Th2 (Zeyda and Stulnig, 2007). Además, los macrófagos M2 secretan TGF β 1 y PDGF que inducen la diferenciación de los fibroblastos hacia los miofibroblastos, estimulan su proliferación y la síntesis de colágeno fibrilar intersticial (Murray y Wynn, 2011).

Si bien la caracterización funcional de los subtipos de macrófagos ha quedado relativamente establecida, su identificación inmunofenotípica a través de marcadores de superficie celular permanece elusiva. Aunque se ha propuesto que proteínas como CD206, CD209 y CD163 sean consideradas marcadores de macrófagos M2, se debe tener en cuenta que macrófagos catalogados como M2 por expresar integrina α 5 β 5, CD1b, CD1c (Zeida and Stuling, 2007)

también son capaces de producir citoquinas inflamatorias que podrían contribuir al desarrollo de la resistencia a la insulina (Zeyda *et al*, 2007). Además, no se han encontrado cambios significativos en el número de macrófagos CD163⁺ y CD206⁺ por la obesidad, sino más bien un incremento en la proporción de macrófagos CD40⁺ respecto a los CD163⁺ y a los CD206⁺ (Aron-Wisnewsky *et al*, 2009). Por otra parte, un estudio llevado a cabo en mujeres obesas ha detectado la presencia de macrófagos CD11⁺ CD206⁺ proinflamatorios asociados con la resistencia a la insulina, con niveles elevados de expresión de moléculas presentadoras de antígeno, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TNF α y ligando-3 de quimioquina CC (Wentworth *et al*, 2010). De éste modo, los miles de receptores de superficie que presentan los macrófagos, la multiplicidad de estímulos bajo cuya influencia se encuentran los mismos y la posibilidad de que los propios macrófagos modifiquen su comportamiento mediante mecanismos autocrinos limitan las aproximaciones actuales sobre el estudio de los subtipos poblacionales de macrófagos (Rees, 2010). Por ello, se piensa que los macrófagos representan un espectro de fenotipos activados más bien que unas subpoblaciones discretas estables (Murray y Wynn, 2011).

Si bien los macrófagos son necesarios durante la iniciación de la inflamación en el tejido adiposo inducida por la dieta, parece ser que el mantenimiento de la inflamación durante la obesidad depende de la inmunidad adaptativa (Chawla *et al*, 2012). La presencia de linfocitos T CD4⁺, unido al hecho de que la mayoría de los macrófagos infiltrados en el tejido adiposo fueron positivos al HLA-DR, ha puesto de manifiesto la contribución de los linfocitos T CD4⁺ al estado de activación de los macrófagos mediante la secreción de IFN γ (Kintscher *et al*, 2008). Las células T efectoras CD8⁺ también parecen contribuir

al reclutamiento de macrófagos y a la inflamación del tejido adiposo en la obesidad, pues estudios *in vivo* han corroborado que tanto el agotamiento inmunológico como genético de células T CD8⁺ en ratones obesos alimentados con dieta alta en grasa disminuye la infiltración de macrófagos y los niveles de expresión de citoquinas proinflamatorias Il-6 y TNF α (Nishimura *et al*, 2009). Mientras que otro estudio *in vivo* ha revelado la participación de las células T CD4⁺ en la progresión de las anormalidades metabólicas asociadas a la obesidad, pues cuando son transferidas hacia ratones con obesidad, inducida por dieta y libre de linfocitos, pueden revertir la ganancia de peso y la resistencia a la insulina fundamentalmente a través de células TH2 (Winer *et al*, 2009). Por consiguiente, el tejido adiposo parece ser un sitio activo donde los macrófagos llevan a cabo la presentación de antígenos a las células T CD8⁺ y células T CD4⁺ mediada por moléculas MHC clase I y clase II respectivamente (Chawla *et al*, 2012).

De acuerdo a todas estas evidencias, la acumulación de especies reactivas del oxígeno, la hipoxia tisular y la inflamación del tejido adiposo son condicionantes tisulares asociados a la obesidad, imbricados estrechamente y cuya permanencia a largo plazo contribuye a la disfunción tisular adiposa. Así, la expansión del tejido adiposo conlleva la formación de áreas tisulares hipóxicas (Regazzetti *et al*, 2009), generadores de especies reactivas de oxígeno mitocondrial (Carrière *et al*, 2004). El propio incremento en los niveles de ácidos grasos acumulados durante la expansión tisular adiposa estimula la producción de ROS en las células adiposas a través de la activación de la NADPH oxidasa (Furukawa *et al*, 2004). A su vez, especies reactivas como el H₂O₂ inducen en los preadipocitos la expresión de citoquinas inflamatorias

como el TNF α y MCP-1 dependiente de la activación del NF- κ B por mediación de p53 (Minamino *et al*, 2009). Tanto las condiciones prooxidativas como los altos niveles de TNF α e hipoxia pueden suprimir fuertemente la expresión de GPx3 adiposa y en consecuencia generar un círculo vicioso por el que se expande la acumulación de ROS (Sok *et al*, 2008), promoviendo aún más la inflamación (Iozzo, 2009).

5-Deterioro Adipogénico del Tejido Adiposo.

Es bien conocido que el establecimiento del estrés oxidativo, la hipoxia tisular y la inflamación afecta el funcionamiento del tejido adiposo y especialmente su capacidad de expansión. Múltiples evidencias han corroborado los efectos negativos de dichas condiciones tisulares en el mantenimiento del estado diferenciado de los adipocitos y en la generación de nuevas células adiposas. Así, la infiltración de macrófagos hacia el tejido adiposo puede afectar la expansión tisular a través de su influencia paracrina sobre la diferenciación adipogénica ya que tanto los preadipocitos (Lacasa *et al*, 2007) como en particular las células CD34⁺/CD31⁻ (Bourlier *et al*, 2008) tratados con medio condicionado procedente de macrófagos muestran una reducción marcada de la adipogénesis. Parte de estos efectos podrían ser atribuido al TNF α , pues desde hace más de una década se ha venido corroborando que es uno de los principales mediadores implicados no sólo en la inducción de la desdiferenciación y delipidación de la célula grasa madura sino también en la inhibición de la diferenciación adipogénica (Petruschke and Hauner, 1993; Prins *et al*, 1997; Hube and Hauner, 2000; Kras *et al*, 2000) por un mecanismo dependiente de Wnt 10b (Isakson *et al*, 2009).

El TGF β es otra de las citoquinas implicadas en la disminución de la diferenciación adipogénica, como ha quedado demostrado en cultivos primarios de células precursoras de adipocitos humanos (Petruschke *et al*, 1994). Según un estudio desarrollado en células estromales de médula ósea humana, la inhibición hipóxica de la adipogénesis requiere la activación de la señalización TGF β /Smad (Zhon *et al*, 2005). Además, la hipoxia puede inhibir la diferenciación adipogénica reprimiendo la activación del promotor de PPAR γ 2 por mediación de la expresión del factor de transcripción CHOP-10/GADD153 estimulada por la generación de especies reactivas del oxígeno mitocondrial (Carrière *et al*, 2004). Existen evidencias en las que se ha corroborado que la generación de ROS afecta a la diferenciación adipogénica influyendo sobre los niveles de expresión de factores transcripcionales adipogénicos ya sea directa o indirectamente por la activación de proteínas de señalización intracelulares sensibles a redox (Gummerbach *et al*, 2009) y la estimulación de la secreción del TNF α por las propias células precursoras (Minamino *et al*, 2009). Por otra parte, variaciones en los perfiles de expresión de micro RNAs de sujetos obesos con y sin diabetes tipo 2 han puesto de manifiesto la implicación de 11 micro RNAs durante la disminución de la diferenciación adipogénica (Ortega *et al*, 2010).

El deterioro funcional del tejido adiposo parece estar acompañado por la remodelación de la arquitectura tisular, fundamentalmente asociada con alteraciones en los porcentajes de adipocitos con tamaños diferentes. De éste modo se ha constatado que el incremento en los niveles de citoquinas inflamatorias como el TNF α , IL6 y en la sensibilidad a la proteína-c-reactiva que presentan los pacientes obesos diabéticos está correlacionada positivamente

con el volumen medio de los adipocitos (Bahceci *et al*, 2007). Mientras la secreción de éstas y otras citoquinas inflamatorias como la IL-8, proteína quimioatrayente de monocitos-1, proteína-10 inducible por interferón- γ , proteína 1β inflamatoria de macrófagos, factor estimulante de colonias de granulocitos, IL-1ra está correlacionada positivamente con el incremento del volumen de los adipocitos (Skurk *et al*, 2007). Otro estudio más reciente ha evidenciado que aunque los tamaños de las células adiposas se distribuyen bimodalmente, con un 47 % en una población celular grande y las restantes en una población celular pequeña, el diámetro medio de las células adiposas grandes no está asociada con la expresión de genes inflamatorios sino más bien es la fracción de células adiposas pequeñas la que se correlaciona positivamente con la expresión de genes inflamatorios, fundamentalmente en los individuos resistentes a la insulina (McLaughlin *et al*, 2010).

La disminución de la expresión de genes que codifican para las proteínas adipogénicas PPAR γ 1, PPAR γ 2, Glut4 se ha visto asociada con el aumento en el porcentaje de adipocitos pequeños/grandes detectada en sujetos obesos resistentes a la insulina en (McLaughlin *et al*, 2007), que en pacientes diabéticos tipo 2 puede incrementarse hasta un 27 % (Pasarica *et al*, 2009). Estudios funcionales *in vivo* han confirmado que la tasa baja de generación de adipocitos se asocia con la hipertrofia del tejido adiposo, de modo tal que los sujetos con hipertrofia generan 70 % menos adipocitos por año (Arner *et al*, 2010). De hecho, la disminución de adipocitos totales descrita en pacientes diabéticos tipo 2 está asociada tanto al aumento del porcentaje de adipocitos hipertrofiados como al incremento en la fracción de adipocitos pequeños (Pasarica *et al*, 2009). Quizás por todo ello es que el tamaño de los adipocitos

subcutáneos permite predecir la incidencia de la diabetes tipo 2 en la vida adulta (Weyer *et al*, 2000; Lönn *et al*, 2010) y que los efectos beneficiosos de los tratamientos con pioglitazona sobre la sensibilidad a la insulina se han visto asociados no sólo al incremento de la gama de tamaños celulares dentro de la categoría de adipocitos hipertrofiados sino también al aumento en un 25 % del número absoluto de adipocitos pequeños (McLaughlin *et al*, 2010).

Por otra parte, parece probable que la remodelación del tejido adiposo subcutáneo pueda tener implicaciones para el funcionamiento y celularidad del tejido adiposo visceral y la distribución de la grasa corporal en general. En efecto, un estudio llevado a cabo en mujeres obesas resistentes a la insulina ha constatado que el diámetro de las células grandes del tejido adiposo subcutáneo se correlacionó significativamente con el incremento en la proporción de células pequeñas tanto en el tejido adiposo subcutáneo como en el visceral (Liu *et al*, 2009). Otro estudio desarrollado en adolescentes obesos también ha confirmado que los sujetos con obesidad visceral presentan mayor proporción de adipocitos pequeños y mayor hipertrofia que los sujetos con obesidad periférica (Kursawe *et al*, 2010).

Parece ser que la masa grasa y la distribución de grasa corporal tienen más influencia sobre el perfil metabólico de los sujetos que el tamaño de los adipocitos (Mundi *et al*, 2010). Múltiples evidencias indican que independientemente de la masa grasa corporal total, el incremento en la acumulación de grasa visceral y la disfunción del tejido adiposo están asociadas con la obesidad resistente a la insulina (Klötting *et al*, 2010). De éste modo, el hecho de que no todos los pacientes con obesidad desarrollen diabetes tipo 2 se ha atribuido en parte al sitio donde se acumula la grasa

(Eckel *et al*, 2011). Así quedó corroborado en un estudio donde se describe que la grasa del tronco confirió, a diferencia de la grasa corporal inferior, una correlación positiva con los factores de riesgos asociados a la obesidad fundamentalmente en los hombres (Vega *et al*, 2006). Otro estudio de seguimiento desarrollado durante 10-11 años en americanos japoneses no diabéticos evidenció que el área grasa intraabdominal permanece como un predictor significativo de la resistencia a la insulina futura (Hayashi *et al*, 2008).

Se ha sugerido que uno de los principales vínculos entre la obesidad y la resistencia a la insulina es la capacidad limitada de expansión del tejido adiposo subcutáneo respecto a la expansión de otros depósitos grasos y la deposición de grasa ectópica en el músculo esquelético e hígado (Huffman and Barzilai, 2009). Los resultados obtenidos en experimentos desarrollados en ratones transgénicos ob/ob han sugerido que la expansión inapropiada del tejido adiposo subcutáneo es un fenómeno subyacente a la resistencia a la insulina, pues la sobre-expresión de adiponectina en los ratones transgénicos permitió que el incremento de sus adiposidad tuviera lugar fundamentalmente en los depósitos subcutáneos, acompañado de una disminución tanto de la infiltración de macrófagos como de la inflamación sistémica (Kim *et al*, 2007). Experimentos *in vivo*, usando técnicas de trasplante tisular, han demostrado que la adición de grasa subcutánea hacia la cavidad visceral mejora significativamente la tolerancia a la glucosa; mientras que la de grasa visceral a la cavidad visceral tiende a deteriorar la tolerancia a la glucosa (Thien *et al*, 2008). Estos resultados han permitido a sus autores proponer que la grasa subcutánea es intrínsecamente diferente de la grasa visceral y produce sustancias que pueden actuar sistémicamente para mejorar el metabolismo de

la glucosa. Además refuerzan la opinión más generalizada de que la grasa visceral presenta mayor carácter proinflamatorio que la grasa subcutánea (Huffman and Barzilai, 2009). Quizás por ello se ha recomendado identificar los factores que controlan la angiogénesis del tejido adiposo y la deposición de tejido adiposo hacia depósitos grasos diferentes para dilucidar la patogénesis que vincula la obesidad y la diabetes tipo 2 (Eckel *et al*, 2011).

6-Deterioro Microvascular en la Obesidad.

La rarefacción, las alteraciones en la proporción pared/lumen y las alteraciones en el tono vasomotor son los tres fenómenos que generalmente se incluyen en la disfunción microvascular, y que contribuyen al incremento de la resistencia vascular periférica asociada a la hipertensión (Jonk *et al*, 2007; Serné *et al*, 2007).

Las alteraciones en el tono vasomotor, a las que se les suele denominar disfunción endotelial, son definidas como una reducción en la disponibilidad de óxido nítrico, vinculada a modificaciones en la señalización insulínica de las células endoteliales que favorecen el desbalance entre el agente vasodilatador óxido nítrico y el vasoconstrictor endotelina-1 (Jansson, 2007). En el caso particular de las células endoteliales microvasculares subcutáneas de sujetos diabéticos tipo 2, se ha corroborado que dichas alteraciones incluyen al substrato receptor insulínico-1, a la vía fosfatidil inositol 3 quinasa así como incrementos en la actividad MAPK (Gagg *et al*, 2009). Al parecer, uno de los mecanismos fisiopatológicos implicados en la disfunción microvascular asociada a la obesidad podrían ser los efectos inhibitorios de los ácidos grasos libres y el TNF α sobre la cascada de señalización de la insulina (Jonk *et al*, 2011) ya que se ha corroborado que la aplicación del TNF α e IL6 a la grasa

perivascular asociada a vasos sanguíneos saludables puede reducir la actividad dilatadora de los vasos y que los vasos sanguíneos de sujetos obesos con síndrome metabólico e inflamación también disminuyen su dilatación (Greenstein *et al*, 2009).

Estudios celulares, fisiológicos, clínicos y epidemiológicos sostienen la relación recíproca entre la disfunción endotelial y la resistencia a la insulina, pues el mejoramiento de la función endotelial disminuye la resistencia a la insulina y el de la sensibilidad a la insulina atenúa la disfunción endotelial (Kim *et al*, 2006). Las alteraciones en el tono vasomotor podrían contribuir a la resistencia a la insulina mediante sus efectos sobre la deposición tisular de glucosa mediada por insulina (Jonk *et al*, 2007). En general, los sujetos saludables presentan un equilibrio entre los efectos dilatadores dependientes de óxido nítrico y los vasoconstrictores asociados a la endotelina-1, mediado por la acción de la insulina en las células endoteliales microvasculares, que garantiza la irrigación intermitente de diferentes regiones tisulares (Jonk *et al*, 2011). Sin embargo, el deterioro de la función microvascular se ha visto asociado con la disminución de la sensibilidad a la insulina así como con el incremento de la presión sanguínea tanto en mujeres delgadas como en obesas (de Jongh *et al*, 2004) y el predominio de los efectos vasoconstrictores ha condicionado que la deposición de glucosa mediada por la insulina quede reducida hasta un 30-40 % en el músculo esquelético (Jonk *et al*, 2007). Además, se ha constatado que el flujo sanguíneo hacia el tejido adiposo de sujetos delgados en ayuna es significativamente más alto que el de los obesos resistentes a la insulina e incrementa posprandialmente sólo en los delgados (Goossens *et al*, 2011). Aunque en otro estudio no se registraron diferencias en la vasomoción

microvascular entre ambos grupos de sujetos durante el estado preprandial, los autores también constataron la falta de respuesta en la vasomoción microvascular de los sujetos obesos después de la ingesta de la bebida azucarada (Jonk *et al*, 2011).

La rarefacción, reconocida ampliamente como una disminución de la densidad de arteriolas, vénulas y capilares, también contribuye al incremento de la resistencia vascular periférica asociada a la hipertensión (Jonk *et al*, 2007; Serné *et al*, 2007). A pesar de la discrepancias entre los estudios donde se ha descrito que la densidad capilar y capacidad angiogénica del tejido adiposo subcutáneo es superior a la del visceral (Gealekman *et al*, 2011) y los que han constatado lo contrario (Van Harmelen *et al*, 2004; Villaret *et al*, 2010; O'Rourke *et al*, 2011), se ha observado que la densidad capilar del tejido adiposo tanto visceral como subcutáneo (O'Rourke *et al*, 2011) o solamente del subcutáneo (Gealekman *et al*, 2011) disminuyen con el incremento del BMI y la resistencia a la insulina. El aumento del porcentaje de grasa corporal y del tamaño del adipocito, junto con la expresión de varios marcadores de células inflamatorias en el tejido adiposo de hombres obesos resistentes a la insulina, también se ha visto asociado negativamente con la densidad capilar (Goossens *et al*, 2011) y la habilidad de la insulina para suprimir la lipólisis se ha correlacionado positivamente con la densidad capilar y los niveles de RNAm del VEGF (Pasarica *et al*, 2010).

A pesar de dichas evidencias, experimentos en modelos *ex vivo* de membrana corioallantoidea de pollo han revelado correlación positiva entre la respuesta angiogénica del tejido adiposo subcutáneo, pero débilmente en el visceral, y la relación cintura/cadera de los sujetos obesos mórbidos (Ledoux *et al*, 2008).

También se ha observado que la densidad vascular del tejido adiposo subcutáneo se correlaciona positivamente con el índice de masa corporal y la del tejido adiposo omental con la circunferencia de la cintura de sujetos con obesidad severa (Lemoine *et al*, 2012). De éste modo, parece probable que los sujetos que conservan la capacidad angiogénica de su tejido adiposo podrían continuar expandiendo el tejido adiposo sin perjuicio del perfil metabólico. De hecho, se ha sugerido que la disminución de la densidad capilar, y la consecuente bajada de la presión parcial de oxígeno tisular, son causas potenciales de la disfunción del tejido adiposo (Pasarica *et al*, 2010). Además, estudios sobre inflamación asociada a la obesidad sugieren que la disfunción vascular del tejido adiposo podría tener lugar antes de la resistencia a la insulina (Ye, 2011).

Es ampliamente reconocido que la densidad capilar está determinada por la angiogénesis dependiente de la proliferación y la formación de túbulos por las células endoteliales. La proliferación endotelial es favorecida por el VEGF y el FGF2, mientras que la formación de túbulos y la maduración capilar son controladas por angiopoyetinas, TGF β y el PDGF (Ye, 2011), que también está implicado en el reclutamiento de pericitos durante la maduración capilar (Ye, 2009). Interesantemente, se ha demostrado que la región apical del tejido adiposo epididimal de ratones es altamente hipóxico y representa un nicho idóneo para el reclutamiento, retención y acción angiogénica de los macrófagos Lyve1⁺ derivados de la médula ósea, caracterizados por niveles altos de expresión del receptor-4 de quimioquina (Cho *et al*, 2007). También se ha constatado que la reducción de la oxigenación del tejido adiposo durante la obesidad humana favorece la secreción de la proteína 1 α inflamatoria de

macrófagos y eleva los niveles de expresión del RNAm CD68 (Pasarica *et al*, 2009). Al parecer, la infiltración de macrófagos contribuye a la expresión elevada del PDGF en el tejido adiposo ya que se han revelado como los mayores productores de dicha citoquina en el tejido adiposo de ratones obesos (Pang *et al*, 2008).

Si bien se ha observado que los niveles del VEGF en el tejido adiposo de ratones ob/ob pueden alcanzar valores elevados (Pang *et al*, 2008) y que su concentración sérica en pacientes obesos está asociada positivamente con el BMI y el contenido de grasa visceral (Miyazawa-Hoshimoto *et al*, 2003; Ye, 2011), la disponibilidad insuficiente de células endoteliales podría estar contribuyendo al fracaso de la estimulación angiogénica (Pang *et al*, 2008). Esta ausencia de respuesta angiogénica también se ha constatado usando modelo transgénico de sobre-expresión de una forma constitutivamente activa del HIF1 α , donde el HIF1 α inicia la fibrosis del tejido adiposo estimulando los niveles de expresión de los colágenos I y III por mediación de LOX (Lysyl oxidase) (Halberg *et al*, 2009). De hecho, se ha descrito una correlación positiva entre la expresión de Col VI y el porcentaje de grasa corporal, pero negativa respecto a las presiones de oxígeno en el tejido adiposo de sujetos con sobrepeso y obesidad, que a su vez presentaron un 44 % de densidad capilar y un 58 % de VEGF más bajo que los sujetos normopesos (Pasarica *et al*, 2009). Además, la disminución en un 58 % del número de capilares positivos para CD31 en los sujetos obesos resistentes a la insulina respecto a los delgados se ha visto asociada al incremento en la expresión de colágeno VI y V (Spencer *et al*, 2011). Según estos autores, el colágeno V, abundante en áreas fibróticas detectadas en sujetos obesos, podría interrumpir

preferentemente la adherencia endotelial hacia estructuras vasculares porque su presencia inhibió la formación *in vitro* de túbulos por las HUVECs.

De acuerdo a estas evidencias, durante los períodos de balance energético positivo parece tener lugar un reemplazamiento de la respuesta angiogénica por una fibrótica asociada a la acumulación de componentes de la matriz extracelular en el tejido adiposo blanco.

7-Fibrosis Tisular Adiposa.

Los depósitos adiposos son considerados histológicamente una modalidad de tejido conjuntivo especializado, que comparte su origen mesenquimático con el tejido cartilaginoso y óseo, pero cuya matriz extracelular no es tan extensa como la de estos tejidos (Ross y Pawulina, 2006). Ha quedado establecido que durante la diferenciación adipogénica la matriz extracelular que rodea al preadipocito va progresando desde una estructura fibrilar a otra de lámina basal, que se asocia a la sobre-expresión de colágeno IV, V, enactina y varios complejos de laminina (Mariman y Wang, 2010). Así, cada adipocito queda rodeado por una matriz extracelular gruesa llamada lámina basal, compuesta mayoritariamente por colágeno IV (Mariman y Wang, 2010) y cuya función se asocia con el soporte mecánico, la protección frente a las fuerzas de compresión y su contribución tanto a la adipogénesis como a la formación del tejido en su conjunto (Khan *et al*, 2009; Mariman y Wang, 2010; Divoux y Clément, 2011).

Más allá de la contribución estructural y funcional de los componentes de la matriz extracelular al tejido adiposo, cada vez más evidencias indican la presencia de una respuesta fibrótica acompañando la remodelación tisular

adiposa durante la sobrenutrición. La fibrosis se identifica como una acumulación desproporcionada de componentes de la matriz extracelular (Divoux *et al*, 2010), que cuando tiene lugar en el tejido adiposo y está asociada a la obesidad e inflamación se ha acuñado con el término fibrosis tisular adiposa (Khan *et al*, 2009).

El SPARC u osteonectina, glucoproteína de la matriz extracelular que une calcio, colágeno e hidroxipatita, se ha revelado como uno de los principales contribuyentes a la fibrosis tisular adiposa asociada a la obesidad y diabetes (Kos y Wilding, 2010). Su expresión y secreción forma parte del mecanismo de diferenciación adipogénica, presentando sus valores mayores durante los estados tempranos de diferenciación y cuando los adipocitos están diferenciados completamente (Kos y Wilding, 2010), especialmente en el tejido adiposo subcutáneo (Kos *et al*, 2009). Sin embargo, desde hace más de una década se ha identificado como una de las proteínas secretadas por los adipocitos que se encuentra sobre-expresada en modelos diferentes de obesidad murina (Tartare-Deckert *et al*, 2001) y cuyos niveles plasmáticos en humanos evidencian una correlación positiva con el BMI (Takahashi *et al*, 2001), la masa grasa, el perímetro de la cintura, y la resistencia a la insulina (Kos *et al*, 2009).

Por otra parte, los colágenos tipo I, III, VI son los isotipos asociados más a menudo con los depósitos fibróticos de los órganos (Divoux y Clément, 2011). En el tejido adiposo de sujetos diabéticos se ha corroborado la sobre-expresión de los colágenos I, IV y VI, mientras que la de los colágenos II y III han tenido niveles más bajos (Khan *et al*, 2009). El colágeno 6a3 en particular se ha revelado como el más abundante en todos los depósitos examinados por Khan

et al (2009), y su expresión en el tejido adiposo subcutáneo abdominal estuvo correlacionada positivamente con el índice de masa corporal y la masa grasa corporal (Pasarica *et al*, 2009). En otro estudio, durante el que se evaluó la fibrosis según los niveles de los isotipos de colágenos 1a1, 3a3 y 6a1 teniendo en cuenta su distribución alrededor del adipocito (fibrosis pericelular) y en el conjunto del tejido (fibrosis total), se pudo constatar que la fibrosis pericelular tanto del tejido adiposo subcutáneo como del omental de los sujetos obesos es superior a la de los normopesos; mientras que la fibrosis total de los obesos sólo llega a ser mayor que la de los normopesos en el depósito omental (Divoux *et al*, 2010).

Si bien se ha corroborado que el colágeno VI es un componente importante de la membrana basal del adipocito ya que se une fuertemente al colágeno IV, mediando el anclaje de la membrana basal a las células e interactuando con otras proteínas matriciales como los proteoglucanos y la fibronectina (Mariman y Wang, 2010), también se ha constatado que su sobre-expresión, particularmente del Col 6a3, incrementa la rigidez tisular y se opone a la hipertrofia del adipocito (Halberg *et al*, 2009). De hecho, experimentos desarrollados en modelos de ratón por estos autores han permitido proponer que la hipoxia tisular generada durante la expansión del tejido adiposo actúa como un iniciador de la disfunción tisular adiposa induciendo el estado local de fibrosis ya que incrementa los niveles de expresión del HIF1 α y que éste, en lugar de estimular la respuesta angiogénica mediante la secreción del VEGFa y la Angiopoyetina-2, activa el programa fibrótico por mediación de la proteína secretada LOX, que estabiliza las interacciones y el entrecruzamiento de los colágenos I, III y la elastina en el espacio extracelular. La restricción de la

hipertrofia de los adipocitos por la acumulación de colágeno fibrilar podría tener como consecuencia directa la deposición ectópica de grasa, alteraciones de la señalización de la insulina y la apoptosis del adipocito hipertrofiado debido a la activación de la vía C-jun N-terminal Kinase (JNK) asociada a las nuevas interacciones entre los componentes de la matriz extracelular y el adipocito hipertrofiado (Divoux y Clément, 2011). Quizás por ello se ha detectado una correlación fuertemente negativa de la fibrosis omental tanto con el tamaño de los adipocitos como con los niveles de triglicéridos de hombres obesos (Divoux *et al*, 2010).

Debido a que la matriz extracelular es crucial no sólo para el mantenimiento de la integridad estructural y funcional del adipocito, sino también para la adipogénesis (Khan *et al*, 2009; Mariman y Wang, 2010; Divoux y Clément, 2011), las alteraciones en los patrones de síntesis y deposición de proteínas matriciales implicadas en las interacciones célula-matriz extracelular también podrían contribuir a la disminución de la diferenciación adipogénica y expansión del tejido adiposo. En efecto, se ha corroborado que los preadipocitos humanos que incrementan el contenido de colágeno formador de fibras y la rigidez de la matriz extracelular también comprometen la diferenciación adipogénica (Chun *et al*, 2006). Además, la inhibición *in vitro* de la síntesis de los Colágenos V y VI puede bloquear la adipogénesis y la acumulación de triglicéridos de un modo dependiente de la dosis (Mariman y Wang, 2010).

Por otra parte, mediante experimentos *in vitro* también se ha demostrado que niveles endógenos de SPARC de 200 ng/mL y exógenos de 2 µg/mL pueden inhibir la adipogénesis afectando los niveles de expresión de los factores de transcripción adipogénicos PPARγ, C/EBPα y C/EBPβ, mientras que

simultáneamente aumenta los del factor de transcripción osteogénico RUNX2 y del gen osteocalcina (Nie y Sage, 2009). En éste mismo estudio los autores demuestran que SPARC también puede inhibir la adipogénesis potenciando la deposición de fibronectina e inhibiendo la de laminina por un mecanismo dependiente de la señalización ILK/ β catenina, que aumenta los niveles de expresión del receptor de fibronectina (la integrina $\alpha 5$) y disminuye los del receptor de la laminina (la integrina $\alpha 6$).

Evidencias procedentes de estudios *in vivo* ponen de manifiesto la contribución de la fracción vascular estromal a la fibrosis tisular adiposa, pues se ha constatado que el 80 % de muerte de los adipocitos de ratones alimentados con dieta alta en grasa no sólo coincide con la expresión máxima de genes inflamatorios y del marcador de macrófagos CD11C, sino también con la deposición extensa de colágeno (Strissel *et al*, 2007). Al parecer, las células de la fracción vascular estromal procedente de los depósitos visceral y subcutáneo de sujetos obesos pueden llegar a expresar de cuatro a doce veces más Col1a1, Col 3a1 y Col 6a1 que la fracción adiposa (Divoux *et al*, 2010).

Los macrófagos podrían contribuir a dichas diferencias ya que pueden expresar la mayor parte de los colágenos, especialmente el isotipo VI (Schnoor *et al*, 2008), y la mayoría de los macrófagos observados en el tejido adiposo de sujetos obesos resistentes a la insulina han estado asociados a las áreas fibróticas (Spencer *et al*, 2010). Además, se ha observado que los niveles de expresión del Col 6a3 se correlacionan positivamente con la quimiotaxis de los macrófagos hacia el tejido adiposo y con el número de macrófagos CD68⁺/CD163⁺/MAC2⁺ por adipocitos (Pasarica *et al*, 2009).

Los preadipocitos también parecen contribuir significativamente a la acumulación de componentes de la matriz extracelular en el tejido adiposo, pues un estudio *in vivo* ha evidenciado que mientras los adipocitos del tejido adiposo sometidos a isquemia mueren a los 28 días, las células troncales/progenitoras sobreviven, se activan y contribuyen a la reparación del tejido adiposo mediante la generación de áreas fibróticas (Suga *et al*, 2010); que sin embargo, también podrían suprimirse por las propias células precursoras mediante la secreción del HGF inducida por el FGF2 liberado desde el tejido dañado (Suga *et al*, 2010) o por la activación más específica de las células precursoras CD34⁺CD31⁻ que proliferan, migran, forman túbulos, e incrementan la densidad capilar bajo los efectos de una mezcla de factores de crecimiento asociados al daño tisular adiposo (Eto *et al*, 2011).

Los análisis de expresión génica indican que los preadipocitos pueden expresar más fibronectina y Col1a1 que los adipocitos y macrófagos, especialmente los derivados del tejido adiposo subcutáneo de sujetos obesos (Keophath *et al*, 2009). Se ha constatado que los preadipocitos tratados con medio condicionado por macrófagos evidencian una reducción marcada de la adipogénesis asociada con el mantenimiento de una matriz rica en fibronectina (Lacasa *et al*, 2007) e incrementan la expresión de más de 5 200 genes representativos de todas las clases de componentes matriciales, especialmente de colágeno I y fibronectina (Henegar *et al*, 2008; Keophiphath *et al*, 2009).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Estímulos transitorios pueden generar respuestas celulares sostenidas, que permanecen a lo largo de generaciones celulares aún en ausencia del estímulo que las provocó (Burrill and Silver, 2010). La generación y mantenimiento de patrones heredables de transcripción génica no sólo es una característica del desarrollo de los organismos pluricelulares (Peterson, 2010) sino que también podría acontecer durante la remodelación del tejido adiposo. De hecho, evidencias recientes indican que la expresión génica del tejido adiposo subcutáneo de sujetos ex obesos no es restaurada completamente aún después de una pérdida de peso extensiva, estable, y de la disminución de la hipertrofia y la inflamación (Cancello *et al*, 2013). Cada vez más estudios corroboran la disminución *in vitro*, fuera del ambiente tisular adiposo, de la capacidad de diferenciación adipogénica de las células precursoras residentes en el tejido adiposo de sujetos obesos (van Harmelen *et al*, 2003; Permana *et al*, 2004; Isakson *et al*, 2009; Fernández *et al*, 2010; Roldan *et al*, 2011; Park *et al*, 2012). Esta alteración intrínseca en la capacidad de diferenciación adipogénica durante la obesidad parece estar acompañada por una reducción de su capacidad de diferenciación hacia otros linajes mesenquimáticos (Roldan *et al*, 2011; De Girolamo *et al*, 2013; Frazier *et al*, 2013; Oliva-Olivera *et al*, 2015), por señales de senescencia celular prematura (Tchkonia *et al*, 2010; Roldan *et al*, 2011) y por el agotamiento de las ASCs proangiogénicas (Oñate *et al*, 2012).

Es por todo ello que mediante el desarrollo del presente estudio nos propusimos corroborar la siguiente hipótesis, llevando a cabo los objetivos que a continuación se anunciarán:

Hipótesis:

Las condiciones tisulares asociadas a los períodos de balance energético positivo podrían generar alteraciones en los patrones heredables de transcripción génica mediante los que las ASCs quedan predispuestas a favor del fenotipo fibrótico e inflamatorio, en detrimento de su función adipogénica y neovascular.

Objetivos Generales y Específicos:

1-Dilucidar la implicación de las ASC visceral y subcutáneo en la remodelación tisular adiposa que tiene lugar en sujetos con perfiles metabólicos diferentes.

1.1-Corroborar la contribución de las ASCs a la generación de adipocitos con niveles reducidos de expresión del transportador de glucosa GLUT4.

1.2-Evaluar los niveles de expresión de proteínas fibróticas y componentes de la señalización TGF- β en las ASCs.

1.3-Describir la susceptibilidad a la apoptosis, el potencial proliferativo, clonogénico y retención superficial del FGF2 en las ASCs.

2-Revelar la contribución de las ASC visceral y subcutáneo a la disminución de la capacidad angiogénica que caracteriza al tejido adiposo durante el empeoramiento del perfil metabólico de los sujetos.

2.1-Confirmar si el empeoramiento del perfil metabólico de los sujetos está acompañado por la disminución de la capacidad de formación de túbulos por las ASCs y la alteración transcripcional de proteínas implicadas en el desbalance redox celular asociado al síndrome metabólico.

2.2-Describir los niveles de secreción del VEGF y el HGF durante la diferenciación adipogénica y la repercusión de la diferenciación adipogénica sobre la expresión de citoquinas inflamatorias por las ASCs.

2.3-Evaluar los efectos del medio condicionado por las ASCs, durante su diferenciación adipogénica, sobre la supervivencia y tubulogénesis endotelial.

3-Esclarecer los efectos de la hipoxia sobre la respuesta neovascular e inflamatoria de las ASC visceral de sujetos con perfiles metabólicos diferentes.

3.1-Describir la capacidad de formación de túbulos, la secreción de citoquinas angiogénicas, el inmunofenotipo y la capacidad migratoria de las ASC visceral sometidas a hipoxia.

3.2-Constatar que el incremento de los niveles de expresión de NADPH oxidasa en las ASC visceral hipóxicas está acompañado por alteraciones en los niveles transcripcionales de citoquinas inflamatorias según empeora el perfil metabólico de los sujetos.

3.3-Evaluar los efectos del medio condicionado por las ASC visceral hipóxicas sobre la supervivencia y tubulogénesis endotelial.

MATERIALES Y MÉTODOS

1-Reclutamiento y Agrupamiento de los Sujetos.

Un total de 69 sujetos fueron reclutados del Hospital Clínico Virgen de la Victoria y Hospital Civil (Málaga, España). Todos los pacientes tuvieron menos de 58 años, ninguno presentó enfermedades infecciosas, diabetes tipo 2 ni tratamiento farmacológico para esta patología. Las biopsias de tejido adiposo visceral (específicamente omental) y subcutáneo fueron obtenidas durante el acto quirúrgico en paciente sometidos a cirugía bariátrica (obesos mórbidos) o colecistectomía (resto de sujetos). El comité ético del hospital aprobó el estudio y se obtuvo el consentimiento informado de todos los participantes. Los sujetos con BMI ≥ 25 fueron agrupados en sujetos con y sin síndrome metabólico aplicando los criterios de la Federación Internacional de Diabetes (Tabla 1).

Tabla 1. Criterios para el diagnóstico clínico del síndrome metabólico.

Fueron considerados sujetos con síndrome metabólico aquellos europeos cuya circunferencia de la cintura superó los límites especificados y, a su vez, cumplieran con dos de los restantes criterios o fueran medicamentados por ello.

Variable Clínica	Mujeres	Hombres
Circunferencia de la Cintura	≥ 80 cm	≥ 94 cm
Colesterol-HDL	< 40 mg/dL	< 50 mg/dL
Glucosa	≥ 100 mg/dL	
Triglicéridos	≥ 150 mg/dL	
Presión Sanguínea	$\geq 130/85$ mm Hg	

2-Aislamiento y Expansión de la Fracción Vascular Estromal Derivada del Tejido Adiposo Visceral y Subcutáneo.

Las muestras de tejido adiposo visceral y subcutáneo procedentes de los donantes intervenidos quirúrgicamente se transportaron desde el quirófano de los respectivos hospitales hacia el laboratorio de investigaciones IBIMA (Málaga, España) en solución salina balanceada Hank's (Sigma, H9269) suplementada con estreptomicina (300 µg/mL) (Sigma; P-0781), penicilina (300 U/mL) (Sigma; P-0781) y anfotericina B (1.5 µg/mL) (Sigma, A-2942). Bajo las condiciones de esterilidad proporcionadas por la cabina de flujo laminar de clase II, las biopsias de tejido adiposo se depositaron en placas de 100 mm (Corning, 430167) (**Figura 1A**), se lavaron con PBS (Sigma, D-1408) para eliminar restos celulares no deseados, y se diseccionaron en pequeñas piezas empleando pinzas y tijeras (**Figura 1B**).

Las biopsias diseccionadas se sometieron a digestión enzimática en una solución de colagenasa tipo I (0.150 % en PBS) (Sigma, C2674-Lote 050M8626V) suplementada con 1.0 % de BSA (Sigma, A-3294) durante setenta minutos en baño de agua a 37°C con agitación. La suspensión tisular obtenida de la digestión enzimática se centrifugó a 500xg durante diez minutos (**Figura 1C**) y se separaron por decantación los adipocitos flotantes de las células de la fracción vascular estromal precipitada, la cual se hizo pasar por filtros con tamaño de poro de 100 micras (BD Falcon, 352360) y se volvieron a centrifugar a 500xg durante cinco minutos. El precipitado celular resultante (**Figura 1D**) se resuspendió en tampón de lisis de eritrocitos (Sigma, R7757) durante 10 minutos a temperatura ambiente y, después de centrifugarse a 400xg durante cinco minutos, se resuspendió en medio de mantenimiento

compuesto por DMEM/F12 (Sigma, D-6421) suplementado con FBS (0.1 mL/mL) (Gibco, 10270-106 Lote 41G3902K), estreptomicina (100 µg/mL), penicilina (100 U/mL), L-glutamina (2 mM) (Sigma, G-7513) y se sembraron en frascos de cultivo celular T25 (Nunc, 156367) ó T75 (Nunc, 156499) (**Figura 1E**).

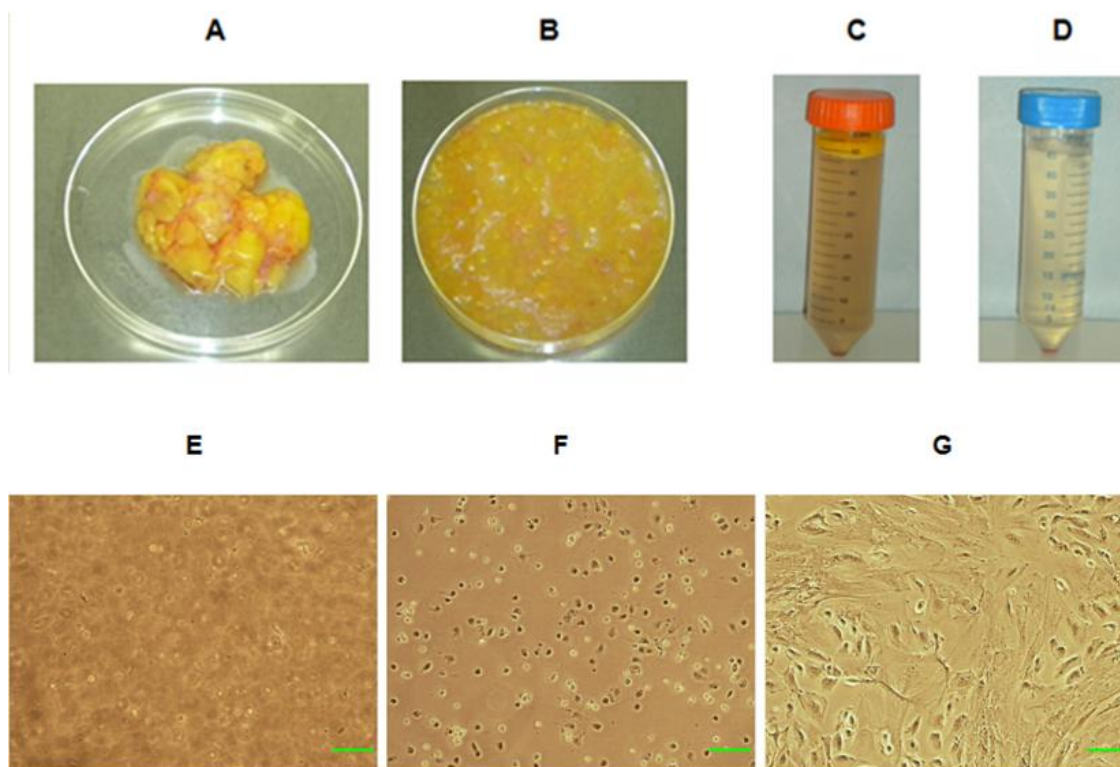


Figura 1. Aislamiento y expansión de la fracción vascular estromal derivada del tejido adiposo. A-B: Biopsia intacta de tejido adiposo (**A**) y aspecto de la biopsia después de su disgregación mecánica (**B**) mediante el uso de pinzas y tijeras. **C-D:** La disgregación enzimática del tejido adiposo seguida por su centrifugación da lugar a una fracción superior, compuesta por adipocitos flotando, y otra inferior conocida como fracción vascular estromal (**C**). La decantación de la fracción adiposa, seguida por filtración, permite el aislamiento definitivo de la fracción vascular estromal (**D**). **E-G:** Aspecto de la fracción vascular estromal recién sembrada (**E**), doce horas (**F**) y ocho días (**G**) después de su siembra. Barra = 100 µm.

Transcurridas aproximadamente 16 horas después de su siembra, se ejecutó el primer cambio de medio a las células adheridas en pase cero (**Figura 1F**) y se les permitió proliferar hasta el octavo día desde su siembra (**Figura 1G**). El número de células necesarias para llevar a cabo los diferentes ensayos se alcanzó mediante subcultivo celular hasta pase dos o tres, en cuyos pases se ejecutaron la mayoría de los experimentos incluidos en el estudio. La proliferación asociada a la expansión celular transcurrió en todo momento bajo condiciones estándares de cultivo a 37°C en atmósfera húmeda y 5 % de CO_{2(g)}, con dos o tres cambios de medio por semana y hasta el 90 % de confluencia. Una vez que los cultivos alcanzaban dicha confluencia, se procedía a su subcultivo, durante los cuales las células fueron lavadas con solución salina PBS, despegadas con solución tripsina/EDTA (pH 7.0-7.6) (Sigma T-3924), cuantificadas según la técnica de exclusión con azul de tripano (0.4 %) (Sigma, T-8154) en cámara de Neubauer (Brand, 718605) y resembradas a una densidad entre 1×10^4 - 1.5×10^4 células/cm².

3-Characterización Inmunofenotípica por Citometría de Flujo.

Las células de la fracción vascular estromal cultivadas en pase dos o tres fueron caracterizadas inmunofenotípicamente por citometría de flujo según los marcadores de superficie celular CD31 (Miltenyi, 130-092-653), CD34 (eBioscience, 11-0349-42), CD44 (Miltenyi, 130-095-195), CD45 (eBioscience, 25-0459), CD73 (BD 550257), CD105 (Miltenyi, 130-094-926), CD140B (RD, FAB 1263P), CD184 (BD, 560669). Brevemente, 1×10^6 células/mL fueron resuspendidas en tampón bloqueador, compuesto por PBS suplementado con BSA al 3.0 %, e incubada durante diez minutos sobre hielo. Se alicuotaron 1×10^5 células por tubo de polipropileno y se les añadió, de acuerdo a las

instrucciones del fabricante, 5.0 μL ó 10 μL de solución de anticuerpos monoclonales de ratón contra los respectivos marcadores de superficie celular, unido con su correspondiente fluorocromo PE, APC, FITC, PE-Cy7. Uno de los tubos fue destinado para el marcaje de los correspondientes controles de isotipo (IgG1-PE, Miltenyi 130-092-212; IgG1-APC, Miltenyi 130-092-214; IgG1-FITC, Miltenyi 130-092-213; IgG1-PE-Cy7, eBioscience 25-4714; IgG2a PE-Cy7 BD 557907). Todos los tubos fueron incubados durante 30 minutos sobre hielo y protegidos de la luz. Las células fueron lavadas dos veces con tampón bloqueador y finalmente resuspendidas en 1000 μL de PBS para la adquisición de 1×10^4 - 1.3×10^4 eventos por tubo mediante un citómetro CyAn™ ADP High-speed Analyzer (Beckman Coulter).

4-Diferenciación Adipogénica.

Las ASC visceral y subcutánea en pase dos o tres fueron sembradas a una densidad de $1 \times 10^4 / \text{cm}^2$ en placas de 24 (Corning, 3526) y seis pozos (Corning, 3516) y se les permitió proliferar hasta el 90 % de confluencia. El medio de mantenimiento fue reemplazado por medio adipogénico, compuesto por DMEM/F12 suplementado con FBS (0.1 mL/ mL), estreptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), penicilina (100 U/mL), L-glutamina (2 mM), Insulina (10 μM) (Sigma, I 9278), Isobutylmetilxantina (0.5 mM) (Sigma, I5879), Dexametasona (1.0 μM) (Sigma, D8893), Pioglitazone (10 μM) (Sigma, E 6910), Rosiglitazone (0.5 μM) (Sigma, R 2408), Biotina (33 μM) (Sigma, B 4501), Pantetonato (17 μM). (Sigma, P5155). Transcurridas 72 horas, éste medio fue reemplazado durante el lapso restante de diferenciación con otro compuesto por DMEM/F12 suplementado con FBS (0.1 mL/ mL), estreptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), penicilina (100 U/mL), L-glutamina (2 mM), Insulina (10 μM), Dexametasona (1.0 μM),

Pioglitazone (10 μ M), Rosiglitazone (0.5 μ M). La confirmación del estado adipogénico a los seis y 21 días se llevó a cabo mediante la tinción de los depósitos intracelulares de lípidos con solución Rojo Nilo (3 % en PBS), preparada a partir de una solución stock AdipoRed (Lonza, PT-7009), y solución de Oil Red O (30 % en PBS) (Alfa Aesar, A12989), preparada a partir de una solución stock de Oil Red O al 0.5 % en isopropanol, respectivamente.

5-Ensayo de Susceptibilidad a la Apoptosis.

Las ASC visceral y subcutánea fueron resuspendidas en medio de mantenimiento y sembradas en placas de seis y 96 pozos (Corning, 3596) a una densidad de 1×10^4 / cm^2 . Después de ocho días bajo condiciones estándares de cultivo, se indujo la apoptosis durante 24 horas sustituyendo el medio de mantenimiento por medio α Minimum Essential Eagle's (Sigma, M2279) libre de FBS o suplementando éste medio con 100 ng/mL de TNF α (MBL, JM-1050-10). Los efectos apoptóticos de ambas condiciones se confirmaron mediante el método TUNEL usando el kit de detección celular *in situ* (Roche, 11 684 817 910) y se cuantificaron por citometría de flujo a través del marcaje de fosfatidilserina con anexina V conjugada a FITC (Miltenyi Biotec, 130-092-052).

Durante la aplicación del método TUNEL, las células cultivadas en placas de 96 pozos se lavaron con PBS, secaron al aire y fijaron durante una hora a temperatura ambiente con formalina neutra tamponada (Sigma, HT5011). Posteriormente se volvieron a lavar con PBS e incubaron durante cinco minutos sobre hielo con solución permeabilizadora recién preparada 0.1 % Triton X-100 (Sigma, T8787) en 0.1 % citrato de sodio (Sigma, 71497). Después de volverse

a lavar con PBS, se añadió la mezcla reacción TUNEL (compuesta por nucleótidos marcados con fluoresceína y la enzima desoxinucleotidil-transferasa terminal) e incubó durante una hora a 37°C en una atmósfera húmeda en la oscuridad. Finalmente, se volvió a lavar con PBS, se marcaron los núcleos con DAPI (Sigma, D9542) y se observaron mediante el microscopio de fluorescencia.

Para la cuantificación por citometría las células cultivadas en placas de seis pozos fueron despegadas con solución tripsina/EDTA, lavadas con tampón de lavado y centrifugadas a 300xg durante diez minutos. El precipitado celular se resuspendió en 100 µL de tampón de lavado, se le añadió 10 µL de Anexina V-FITC e incubó durante 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente, la células se volvieron a lavar y centrifugar a 300xg durante diez minutos, se resuspendieron en 500 µL de tampón de lavado y marcaron con 5.0 µL de solución Ioduro de Propidio inmediatamente antes del análisis por citometría de flujo.

6-Determinación del Tiempo de Doblaje Poblacional.

Las ASC visceral y subcutánea en pase dos fueron sembradas por duplicado a una densidad de 3 000 células/cm² en placas de doce pozos (Corning, 3513). Las células fueron despegadas con solución tripsina/EDTA (pH 7.0-7.6) a los cuatro, seis y ocho días de cultivo, y cuantificadas mediante la técnica de exclusión con azul de tripano en cámara de Neubauer. El tiempo de doblaje poblacional (PDT) fue calculado usando la fórmula $PDT = 48 / \log_2 (N_2/N_1)$, donde N₁ y N₂ es el número de células en el día seis y ocho, respectivamente, después de la siembra.

7-Ensayo de Unidades Formadoras de Colonias Fibroblásticas.

Las ASC visceral y subcutánea en pase uno o dos fueron sembradas por duplicado a una densidad de 50/cm² en placas de seis pozos y se incubaron bajo condiciones estándares de cultivo celular de 37°C en atmósfera húmeda de aire con 5 % CO₂ (g). Transcurrido 14 días, se fijaron y tiñeron durante 15 minutos con solución de cristal violeta (0.5 % en metanol) (Panreac; 131762), se lavaron con agua destilada y secaron al aire. Durante el recuento se consideraron como colonias las agrupaciones con más de 50 células (**Figura 2**).

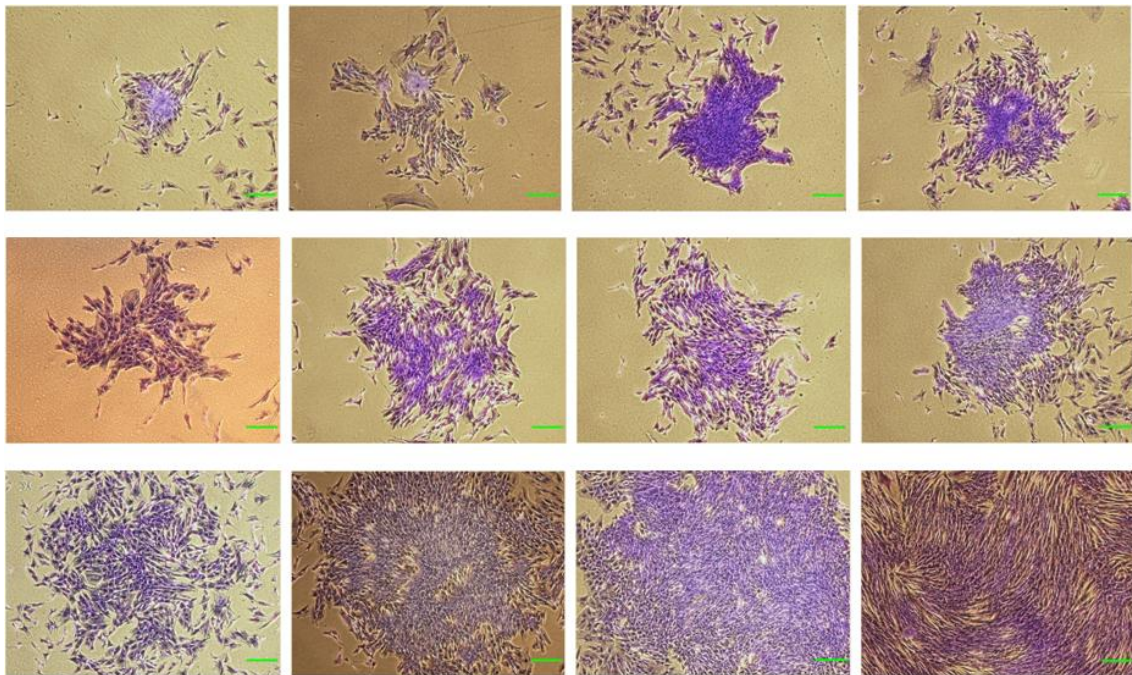


Figura 2. Morfología y diversidad de tamaños de las colonias generadas por el cultivo a baja densidad de las ASCs. Transcurridos 14 días bajo condiciones estándares de cultivo celular, las colonias fueron fijadas con metanol y teñidas con cristal violeta. Barra = 250 μ m.

8-Ensayo de Formación de Túbulos Endoteliales por las ASCs.

Se añadió 50 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$ de matrigel empobrecido en factores de crecimiento (BD, 356231) a placas de cultivo celular de 48 pozos (Corning, 3548) pre-enfriadas a 4°C e incubó durante 30 minutos a 37°C para permitir la solidificación del matrigel. Las ASC visceral y subcutánea se resuspendieron en medio basal endotelial (PromoCell; C-22220) suplementado con FCS (0.05 mL/ mL) (PromoCell, C-37350), se sembraron por duplicado a una densidad de 1×10^5 células/ cm^2 , e incubaron durante seis horas bajo condiciones estándares de cultivo a 37°C en atmósfera húmeda y 5 % de CO_2 (g) o bajo condiciones de 1 % O_2 (g), 94 % de N_2 (g) y 5 % de CO_2 (g) proporcionadas por el incubador de hipoxia (Thermo Scientific 3141 Series II Water Jacket) en los experimentos en los que se describe la capacidad de las ASCs visceral para formar estructuras tubulares bajo hipoxia. Transcurridas las seis horas, se procedió a examinar los túbulos por microscopía de contraste de fase fluorescente (Nikon, Japón) con objetivo 4X, seleccionando aleatoriamente y fotografiando cuatro campos por réplica. Posteriormente se cuantificaron las estructuras tubulares con ayuda del procesador de imágenes NIS Elements Nikon, considerando como túbulos aquellas cuya longitud superaron cuatros veces el ancho.

9-Ensayo de Quimiotaxis de las ASCs Inducido por el SDF1 α .

Las ASC visceral incubadas previamente durante 72 horas bajo condiciones de normoxia (21 % de O_2 (g)) o hipoxia (1 % de O_2 (g)) fueron resuspendidas en medio basal endotelial (PromoCell; C-22220) suplementado con FCS (0,05 mL/ mL) y se distribuyeron por duplicado 3×10^4 células sobre la cámara superior de las placas transwell 6,5 mm con tamaño de poro 8 μM (Corning, 3422). El espacio inferior de las cámaras estuvo ocupado o bien por medio basal

endotelial suplementado con FCS (0.05 mL/ mL) y 100 ng/mL de SDF1 α (RD Systems, 350-NS-010) o bien por medio basal endotelial suplementado solamente con FCS (0.05 mL/ mL).

Posteriormente, se les permitió que migraran incubándolas durante 24 horas en condiciones estándares de cultivo celular. Transcurrido éste lapso, se eliminaron cuidadosamente las células no migratorias retenidas en la superficie superior de la cámara migratoria mediante un bastoncillo de algodón (cotton tip applicator) y las células que migraron hacia la superficie inferior de la cámara transwell fueron lavadas con PBS y fijadas incubándolas con formalina neutra tamponada durante 15 minutos. Finalmente, se marcaron los núcleos incubando las células con DAPI (2.0 μ g/mL) (Sigma, D9542) y se procedió a examinar las células migradas mediante el uso del microscopio de contraste de fase fluorescente (Nikon, Japón) con objetivo 10X, seleccionando aleatoriamente y fotografiando cinco campos por réplica. El número de células migradas por condición experimental se determinó mediante el procesador de imágenes NIS Elements Nikon y las células que migraron bajo los efectos quimiotácticos del SDF1 α se calculó dividiendo el número de células detectadas en presencia del SDF1 α respecto a las observadas en ausencia del SDF1 α tanto para las células cultivadas previamente bajo la condición de normoxia como de hipoxia.

10-Obtención del Medio de Cultivo Condicionado por las ASCs

Las ASCs fueron resuspendidas en medio de mantenimiento, sembradas en placas de seis pozos a una densidad de 1.5×10^4 células/cm² y mantenidas en condiciones estándares de cultivo durante siete-diez días. Posteriormente se

substituyó dicho medio por los respectivos medio de cultivo según los diferentes ensayos. Transcurridas 72 horas, se recolectó el medio condicionado procedente del cultivo de las ASCs en las respectivas condiciones experimentales, se centrifugó a 300xg durante cinco minutos y se reservó en alícuotas de 450 μ L en -80°C hasta su uso en los experimentos de bioactividad sobre las HUVECs o para la cuantificación mediante ELISAs de las citoquinas secretadas por las ASCs. Para determinar los niveles del FGF2 presentes en la superficie celular de las ASCs, asociados a la señalización autocrina (Zaragosi et al, 2006), se lavaron las células con una solución 2.0 M NaCl (20 mM HEPES, pH 7.4) durante cinco segundos y se recolectó dicho medio de lavado según el procedimiento descrito para el medio condicionado.

11-Evaluación de la Bioactividad del Medio Condicionado por las ASCs sobre la Supervivencia y Formación de Túbulos por las HUVECs.

Los efectos del medio condicionado por las ASCs, cultivadas en las diferentes condiciones experimentales, sobre la supervivencia de las células endoteliales se determinaron sembrando las HUVECs (PromoCell, C-12200) a una densidad de 1×10^4 células/ cm^2 en placas oscuras de 96 pozos (Sigma, CLS 3916) en medio basal endotelial suplementado con FCS (0.05 mL/ mL) e incubándolas durante 24 horas en condiciones estándares de cultivo celular. Transcurrido éste tiempo, las HUVECs se lavaron con PBS y su medio de cultivo se substituyó por 200 μ L de medio condicionado por las ASCs usando dos réplicas según las diferentes condiciones experimentales. Pasadas 72 horas de cultivo en el medio condicionado, se desecharon las células muertas mediante lavado con PBS, las que sobrevivieron y mantuvieron adheridas a la superficie de cultivo se reservaron a -80°C durante al menos una semana para

su posterior cuantificación mediante la aplicación del kit Cyquant Cell Proliferation (Invitrogen, C7026). Durante la cuantificación se descongelaron las placas oscuras de 96 pozos, se añadió 200 μ L de tampón de lisis celular (Invitrogen, buffer CyQUANT/Cell Lysis) mezclando suavemente, se incubó la placa durante cinco minutos a temperatura ambiente y protegida de la luz, y finalmente se midió la fluorescencia usando un lector de microplaca fluorescente (Biotek FLX800) equipado con filtro de excitación 480 nM y emisión 520 nM. La viabilidad celular se estimó por intensidad de fluorescencia, dividiendo el valor de fluorescencia emitido en los pozos donde las HUVECs se cultivaron en el medio condicionado respecto a la emitida en los pozos donde las HUVECs se cultivaron en el medio no condicionado.

Para la descripción de los efectos del medio condicionado sobre la formación de túbulos por las HUVECs se procedió a recubrir placas pre-enfriadas de 96 pozos (Corning, 3596) con 25 μ L de matrigel empobrecido en factores de crecimiento e incubarlas durante 30 minutos a 37°C. A cada pozo se le añadió 90 μ L del medio de cultivo condicionado por las ASCs, según las respectivas condiciones experimentales, y 25×10^3 HUVECs resuspendidas en 10 μ L Medio Basal de Células Endoteliales (0 % FCS). Las células se cultivaron en condiciones estándares durante 24 horas, transcurridas las cuales se procedió a examinar los túbulos endoteliales usando microscopio de contraste de fase fluorescente (Nikon, Japón) con objetivo 4X, seleccionando aleatoriamente y fotografiando cuatro campos por duplicado para cada condición experimental. Posteriormente se cuantificaron las estructuras tubulares, considerando como túbulos aquellas cuya longitud superara cuatro veces el ancho, con ayuda del procesador de imágenes NIS Elements Nikon.

12-Determinación de la Concentración de Citoquinas Secretadas por las ASCs.

La secreción del FGF2, HGF, VEGF por las ASCs en los diferentes ensayos desarrollados en el estudio fue cuantificada mediante los respectivos Kits ELISAs sándwich disponibles comercialmente (R&D Systems, DFB50; DHG00; DVE00, respectivamente). Brevemente, una microplaca de 96 pozos fue recubierta por el fabricante con un anticuerpo monoclonal específico para la citoquina en cuestión. Se preparó una solución estándar a partir de diluciones sucesivas de concentración conocida que, junto con las muestras de medio condicionado o lavado, fueron pipeteados hacia los pocillos. La citoquina presente en las respectivas muestras fue unida por el anticuerpo inmovilizado (dos horas de incubación a temperatura ambiente) y, después de desechar por lavado cualquier sustancia no unida, se adicionó a los pozos un anticuerpo policlonal proporcionado por el fabricante, unido a enzima, y específico para la citoquina en cuestión (dos horas de incubación a temperatura ambiente). Después del lavado aplicado para remover cualquier reactivo enzimático no unido al anticuerpo, se añadió a los pocillos una solución de sustrato (20 minutos de incubación a temperatura ambiente y en la oscuridad), que desarrolló un color en proporción a la cantidad de citoquina unida al anticuerpo monoclonal. La intensidad del color o densidad óptica de cada pozo se cuantificó usando un lector de placa (Versamax Microplate Reader) a una longitud de onda 450 nm. Los valores de concentración de las respectivas citoquinas fueron generados a partir de la curva estándar construida con los valores de concentración de la solución estándar (sobre el eje-X) y sus respectivos valores de absorbancia (sobre el eje-Y), usando el programa

(SoftMax Pro 5.2) para generar el ajuste de curva indicado por el fabricante en cada caso. Los valores de concentración de todas las citoquinas son expresados como picogramos/mL (media \pm error estándar) normalizados para 1×10^6 células, teniendo como referencia el número de células cuantificadas en el momento en que se recolectó el medio de lavado o medio de cultivo condicionado.

13-Extracción del RNA.

Las células cultivadas fueron lisadas usando 800 μ L de STAT-60 (Amsbio, CS-111) y el homogenizado resultante fue resuspendido e incubado durante cinco minutos a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de los complejos nucleoproteicos. Durante la extracción del RNA se añadió 160 μ L de cloroformo (Sigma, C2432), se volteó vigorosamente durante 15 segundos e incubó a temperatura ambiente durante tres minutos. Seguidamente se centrifugó el homogenizado a 12 000xg durante 15 minutos a 4°C. De éste modo, el homogenizado se separó en dos fases: una fase inferior orgánica, que contiene el DNA y las proteínas; y otra fase superior acuosa, menos coloreada, que es donde permanece el RNA. Posteriormente se procedió a la precipitación del RNA añadiendo 400 μ L de isopropanol frío (Sigma, I9516), incubando durante 30 minutos a 4 °C y centrifugando a 12 000xg durante 10 minutos a 4°C. El precipitado de RNA obtenido fue lavado añadiendo 800 μ L de etanol (Sigma, 51976) al 75 %, aplicando vortex y centrifugando a 7 500xg durante 5 minutos a 4°C. Finalmente se desechó el etanol y resuspendió en agua libre de nucleasas (Sigma, W4502). La cuantificación se llevó a cabo a una longitud de onda de 230 nm mediante el uso del NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Scientific).

14-Síntesis del DNA Complementario y qPCR.

El RNA fue reverso transcripto hacia cDNA en el termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystem) usando la enzima reversotranscriptasa en presencia de la mezcla de desoxinucleótidos trifosfatos de adenina, guanina, citocina y timina así como de primers aleatorios e inhibidor de RNAasas según instrucciones de los fabricantes (Roche, 03531287001; Applied Biosystem, 4374966).

Las reacciones qPCR fueron ejecutadas en microplacas de reacción de 96 pozos (Applied Biosystem, 4346907), sobre un sistema PCR ABI 7500 real-time (Applied Biosystem) y usando ensayos de expresión génica TaqMAN específicos para todos los genes. Se emplearon 10 ng ó 20 ng de cDNA por pozo según el diseño experimental, cada muestra fue evaluada por duplicado y en todas las reacciones se incluyeron controles negativos. Las reacciones consistieron básicamente en una desnaturalización inicial de 10 minutos a 95 uC, seguidos por 40 ciclos de 15 segundos de la fase de desnaturalización a 95 uC y un minuto de alineamiento y extensión a 60 uC. Se obtuvo un valor Ct (ciclo umbral) para cada curva de amplificación y se calculó el valor ΔCt mediante la substracción del valor Ct para RPL13A (control endógeno) del valor Ct obtenido para los genes evaluados en los respectivos experimentos (Tabla 2). De éste modo, las señales específicas fueron normalizadas respecto al control endógeno acorde a la fórmula $2^{-\Delta Ct}$. Durante los experimentos de diferenciación adipogénica los valores de expresión del RNAm GLUT4, CEBP α y PPAR γ se cuantificaron según la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, donde $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ adipogénico- ΔCt control.

Tabla 2. Genes evaluados por qPCR, con su respectivo código y secuencia de referencia según instrucciones de Applied Biosystem.

Gen Diana	Código	Secuencia de Referencia
CEBP α	Hs 00269972_s1	NM_004364.3
Col1a1	Hs 00164004_m1	NM_000088.3
FN1	Hs 00365052_m1	NM_002026.2
GLUT4	Hs00168966_m1	NM_001042.2
IL1 β	Hs01555410_m1	NM_000576.2
IL8	Hs00174103_m1	NM_000584.3
MCP1	Hs00234140_m1	NM_002982.3
NOX4	Hs00418356_m1	NM_001143836.1
NOX5	Hs00225846_m1	NM_001184779.1
PPAR γ	Hs01115513_m1	NM_005037.5
RPL13A	Hs 04194366-g1	NM_001270491.1
SMAD7	Hs 00998193_m1	NM_001190821.1
SOD1	Hs00533490_m1	NM_000454.4
SOD3	Hs00162090_m1	NM_003102.2
TGFBR1	Hs00610320_m1	NM_001130916.1
TGFBR2	Hs00234253_m1	NM_001024847.2
TGF β 1	Hs00998133_m1	NM_000660.4

15-Extracción de Proteínas Citoplasmáticas y Western Blot.

Las ASCs cultivadas en pase tres fueron lavadas con PBS, despegadas con Tripsina-EDTA y centrifugadas a 500xg durante cinco minutos. Después de su recuento celular, se volvieron a lavar con PBS, centrifugaron a 500xg durante cinco minutos y se dejó el precipitado celular tan seco como pudo ser posible dentro de tubos de micro centrífuga (Sarstedt, 72 695 500) depositados sobre hielo. Se añadió 20 µL de CER-I (Thermo Scientific, 78835A), suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (Thermo Scientific, 78443), por cada 1×10^5 células, y se volteó e incubó sobre hielo durante 10 minutos. Posteriormente se añadieron 11 µL de CER-II (Thermo Scientific, 78835AB) por cada 1×10^5 células, se volteó y centrifugó a 16 000xg durante cinco minutos a 4°C. El extracto proteico citoplasmático contenido en el sobrenadante fue transferido hacia otro tubo de micro centrífuga, se cuantificaron las proteínas totales a 595 nm aplicando el kit Coomassie Plus (Thermo Scientific, 23236) y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Para llevar a cabo el western blot, 22 µg del extracto proteico citoplasmático fue resuspendido en tampón de carga Laemmli (Bio-Rad, 161-0747) suplementado con el agente reductor 2-Mercaptoetanol (Bio-Rad, 161-0710) y las proteínas fueron separadas durante una hora por electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5 % (Bio-Rad, 456-1025) en tampón Tris/Glicina/Dodecilsulfato sódico (Bio-Rad, 161-0732). Posteriormente se procedió a la transferencia húmeda desde el gel hacia la membrana 0.2 µm PVDF (GE Healthcare, 10600122) en tampón Tris/Glicina (Bio-Rad, 161-0734) suplementado con dodecilsulfato sódico (0.02%) (Sigma, 71725) y metanol (al 20 %) (Panreac, 361091.0314). Después de una hora de transferencia, las

membranas fueron bloqueadas con tampón salino Tris (Bio-Rad, 170-6435), suplementado con Tween 20 (0.1%) (Sigma, P9416) y albúmina sérica bovina (5.0%) durante una hora a temperatura ambiente.

Durante la detección inmuno-específica, las membranas fueron incubadas durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo primario monoclonal Anti-Smad7 generados en ratón (sc-365846) (dilución 1/100 en tampón salino Tris suplementado con 0.1 % Tween 20) y posteriormente con el anticuerpo secundario policlonal conjugados con peroxidasa de rábano específico para IgG1 de ratón (Abcam, ab98693) (dilución 1/5000 en tampón salino Tris suplementado con 0.1 % Tween 20) durante una hora a temperatura ambiente. Los inmunocomplejos fueron detectados por solución quimioluminiscente (Bio-Rad, 170-5060) usando el Universal Hood II-ChemiDoc XRS, seguido por la eliminación de la señal mediante incubación durante 15 minutos a 37 °C en tampón de Stripping (Thermo Scientific, 21059). Posteriormente, para generar una medida de control de carga, las membranas fueron incubadas durante 14 horas a 4°C con el anticuerpo primario monoclonal Anti-Vinculina producidos en conejo (Abcam, 129002) (dilución 1/10 000 en tampón salino Tris suplementado con 0.1 % Tween 20) y seguidamente con el anticuerpo secundario policlonal conjugados con peroxidasa de rábano específico para IgG de conejo (Abcam, ab97051) (dilución 1/10 000 en tampón salino Tris suplementado con 0.1 % Tween 20) durante una hora a temperatura ambiente. Igualmente, los inmunocomplejos fueron detectados por solución quimioluminiscente usando el Universal Hood II-ChemiDoc XRS. Los períodos de incubación con las respectivas diluciones de

anticuerpos fueron procedidos por lavados con tampón salino Tris suplementado con Tween 20 (0.1%).

Los niveles de la proteína Smad7 fueron cuantificados como densidad óptica integrada, usando el programa de procesamiento de imágenes ImageJ (National Institute of Health, USA), expresados como cantidades relativas (RQ) respecto a los valores de densidad óptica del respectivo control de carga Vinculina, y tomando como control estándar el extracto proteico de la fracción citoplasmática de las ASC visceral y subcutáneo de un sujeto normopeso.

16-Análisis Estadístico.

Los resultados fueron expresados como valores medios \pm error estándar. Las comparaciones entre más de dos grupos se ejecutaron mediante el test no paramétrico U Kruskal Wallis y entre pares de grupos no pareados a través de la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. La correlación entre variables se calculó según el coeficiente Rho de Spearman. Todo el análisis estadístico fue ejecutado usando SPSS (version 17.0; SPSS Inc, Chicago, IL). Valores de $P < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

RESULTADOS

1-Implicación de las ASC Visceral y Subcutáneo en la Remodelación Tisular Adiposa.

1.1-Caracterización antropométrica y perfil metabólico de los sujetos.

La **Tabla 3** muestra las características clínicas de los sujetos. Los pacientes con (SM) y sin síndrome metabólico (NoSM) tuvieron significativamente mayor índice de masa corporal (BMI), circunferencia de la cintura, relación cintura cadera, ácido úrico y menor colesterol-HDL respecto a los sujetos normopesos. Los sujetos SM evidenciaron mayor deterioro en su perfil metabólico porque, exceptuando la presión sanguínea sistólica, la creatinina y la urea, todas las variables metabólicas evaluadas en estos pacientes mostraron diferencias estadísticamente relevantes respecto a uno de los grupos o a los dos grupos restantes de pacientes.

1.2-Disminución de los niveles de expresión del RNAm GLUT4 en las ASC visceral y subcutáneo de sujetos SM.

Estudios desarrollados en modelos de ratón manipulados genéticamente han demostrado que la disminución de las cantidades del transportador de glucosa GLUT4 sobre la superficie del adipocito es un fenómeno lo suficientemente relevante como para provocar alteraciones en el estado metabólico de los organismos (Huang y Czech, 2007). De hecho, desde hace varias décadas se ha venido corroborando que la disminución de los niveles transcripcionales y proteicos de GLUT4 en el tejido adiposo está estrechamente vinculado a la resistencia a la insulina (Garvey *et al*, 1991).

Table 3. Características biológicas y clínicas de los sujetos normopesos (Np), pacientes sin síndrome metabólico (NoSM) y pacientes con síndrome metabólico (SM).

Variable	Np (n=11)	NoSM (n=24)	SM (n=34)
Edad, años	40.73 ± 2.30	40.92 ± 1.92	44.79 ± 1.35
BMI, Kg/m ²	23.39 ± 0.38	35.52 ± 1.78*	38.86 ± 1.89*
Circunferencia Cintura, cm	80.55 ± 2.13	113.25 ± 3.83*	119.46 ± 4.06*
Relación Cintura Cadera	0.862 ± 0.02	0.922 ± 0.01*	0.948 ± 0.01*
HOMA-IR	1.70 ± 0.19	2.37 ± 0.22	4.23 ± 0.28* [†]
Insulina, µIU/mL	7.10 ± 0.78	9.92 ± 0.93	16.15 ± 1.05* [†]
Glucosa, mg/dL	95.55 ± 2.60	92.33 ± 2.31	106.38 ± 2.39* [†]
Triglicéridos, mg/dL	96.09 ± 14.98	109.88 ± 6.57	181.88 ± 20.70* [†]
Colesterol-HDL, mg/dL	59.91 ± 3.83	48.75 ± 3.06*	41.68 ± 2.76* [†]
Colesterol-LDL, mg/dL	97.18 ± 5.72	106.30 ± 7.33	134.90 ± 4.45* [†]
Colesterol-Total, mg/dL	178.09 ± 7.15	176.63 ± 7.69	210.53 ± 7.16* [†]
P S Sistólica, mm Hg	119 ± 5.04	127 ± 2.66	130 ± 3.10
P S Diastólica, mm Hg	73 ± 3.65	78 ± 2.03	84 ± 1.95* [†]
Hemoglobina Glicada, %	5.36 ± 0.12	5.28 ± 0.07	5.62 ± 0.06 [†]
Apoproteína A, mg/dL	176.09 ± 7.99	155.13 ± 5.64	152.47 ± 7.53*
Apoproteína B, mg/dL	80.38 ± 4.45	88.23 ± 4.88	117.99 ± 4.45* [†]
Creatinina, mg/dL	0.71 ± 0.06	0.69 ± 0.05	0.79 ± 0.04
Urea, mg/dL	24.40 ± 1.63	27.17 ± 1.33	29.38 ± 1.61
Ácido Úrico, mg/dL	3.29 ± 0.19	4.52 ± 0.23*	5.22 ± 0.29*

Valores medios ± error estándar. * Valores significativamente diferentes (Mann-Whitney; P < 0.05) respecto al de los sujetos Np. [†] Valores significativamente diferentes (Mann-Whitney; P < 0.05) respecto al de los sujetos NoSM.

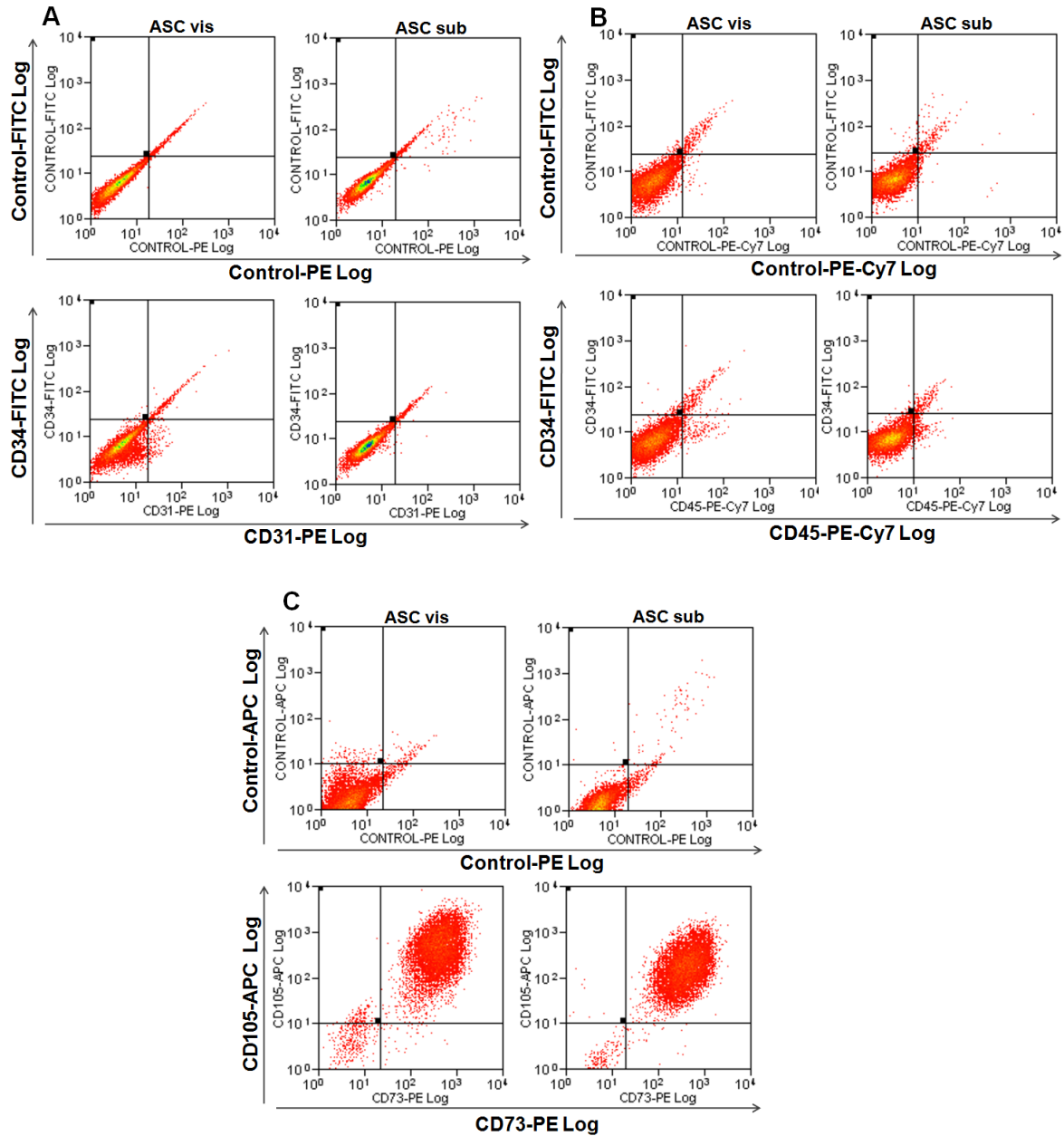


Figura 3. Caracterización inmunofenotípica de las ASC visceral y subcutáneo en pase tres de sujetos con perfiles metabólicos diferentes.
A: Porcentaje de células endoteliales CD34⁺CD31⁺ en las ASC visceral (2.59 ± 0.47) y en las ASC subcutáneo (1.71 ± 0.23). **B:** Porcentaje de macrófagos CD34⁺CD45⁺ en las ASC visceral (1.93 ± 0.36) y en las ASC subcutáneo (1.49 ± 0.17). **C:** Elevado porcentaje de células coexpresando los marcadores comunes de células mesenquimales multipotenciales CD73 y CD105, tanto en las ASC visceral (94.49 ± 1.03) como en las ASC subcutáneo (95.82 ± 0.99) (n=11).

Para verificar la posible contribución de las ASC a la generación de adipocitos con niveles inferiores de expresión de GLUT4, aislamos la fracción vascular estromal adiposa según procedimientos ampliamente establecidos e indujimos la diferenciación adipogénica *in vitro* de las ASC visceral y subcutáneo de sujetos con perfiles metabólicos diferentes.

La caracterización inmunofenotípica de las ASC visceral y subcutáneo en pase tres confirmó la ausencia de contaminación por células endoteliales CD34⁺CD31⁺ (**Figura 3A**) y macrófagos CD34⁻CD45⁺ (**Figura 3B**). Además, el número de células que coexpresaron los marcadores de células mesenquimales multipotenciales CD73 y CD105 superó el 90 % en las ASCs derivadas de ambos tejidos (**Figura 3C**).

La tinción con rojo oleoso confirmó la acumulación citoplasmática de lípidos en las ASCs cultivadas durante 21 días en medio adipogénico (**Figura 4A**). El análisis de expresión génica reveló una correlación negativa estadísticamente significativa del RNAm GLUT4 de las ASC visceral y subcutáneo con el BMI y HOMA-IR de los pacientes (**Figura 4B**).

Relevantemente, sólo las ASC visceral y subcutáneo de los sujetos SM mostraron una disminución significativa en los niveles de expresión GLUT4 respecto a las ASCs de los sujetos Np, que no estuvo acompañada por diferencias estadísticamente significativas en las cantidades de RNAm de los factores transcripcionales PPAR γ y C/EBP α (**Figura 4C**). Además, las diferencias significativas en los niveles de expresión GLUT4 entre las ASCs de sujetos SM y NoSM se limitaron a las observadas entre las ASC subcutáneo (**Figura 4C**).

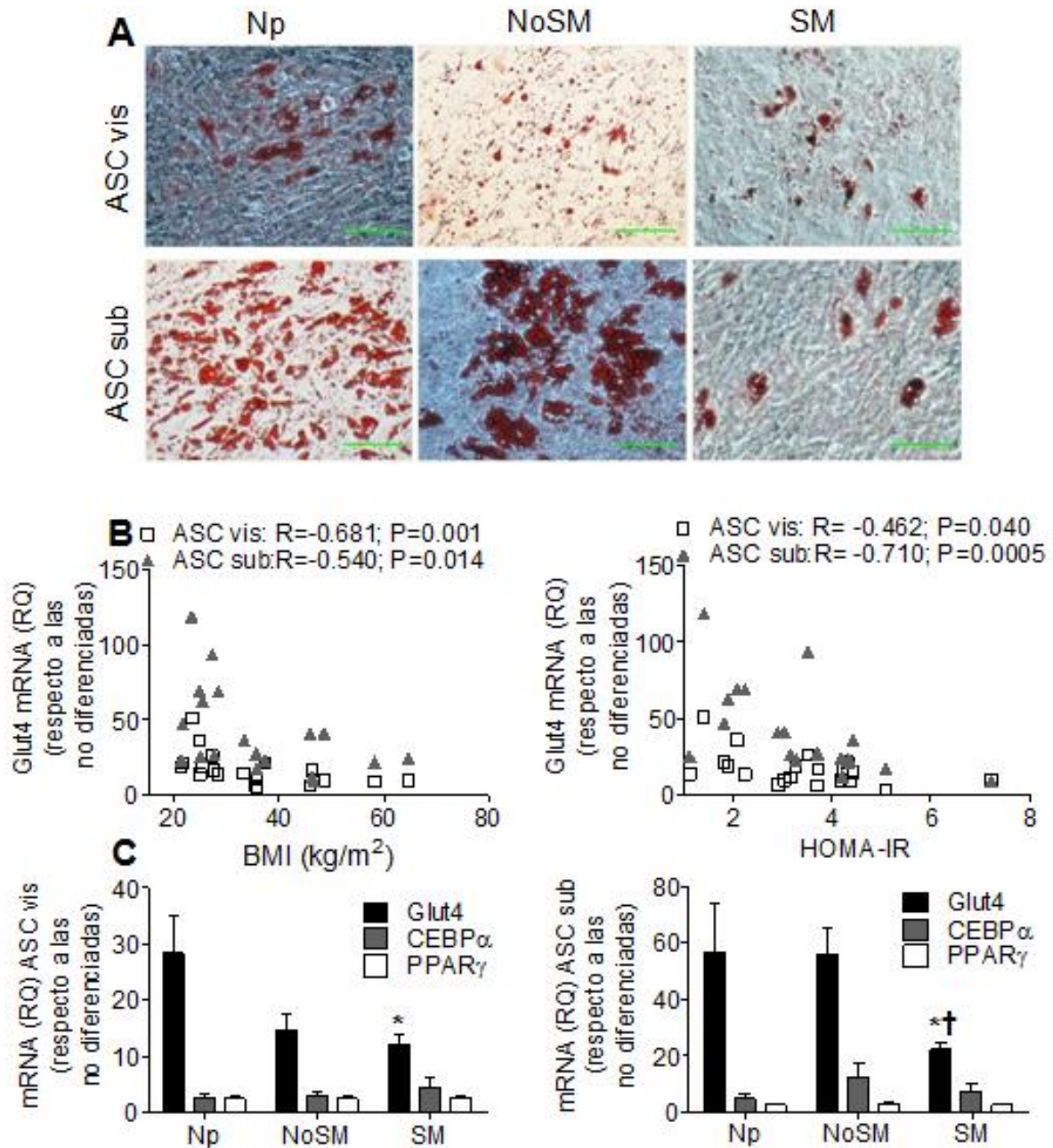


Figura 4. Diferenciación adipogénica de las ASC visceral y subcutáneo durante 21 días. **A:** Tinción con rojo oleoso de los lípidos acumulados en el citoplasma de las ASCs después de 21 días de cultivo en medio adipogénico. Barra = 100 μ m. **B:** Correlación de los niveles de expresión del RNAm Glut4 con el BMI y el HOMA-IR de los sujetos. **C:** Niveles de expresión del RNAm Glut4, CEBP α y PPAR γ en las ASCs de sujetos agrupados según su perfil metabólico. Los valores del RNAm de Glut4, CEBP α y PPAR γ fueron determinados por qPCR y normalizados respecto al RNAm RPL13A. (Np = 5; NoSM = 6; SM = 9). *, Resultados significativamente diferentes (Mann-Whitney; P < 0.05) al de los sujetos Np; †, resultados significativamente diferentes (Mann-Whitney; P < 0.05) al de los sujetos NoSM.

1.3-La disminución del RNAm GLUT4 en las ASC visceral y subcutáneo está correlacionada con el incremento de los niveles de expresión de proteínas fibróticas.

Experimentos *in vitro* han demostrado que las alteraciones en el patrón de expresión de proteínas de la matriz extracelular pueden afectar la expresión de genes del linaje adipogénico (Chun *et al*, 2006; Mariman y Wang, 2010). Por ello seguidamente examinamos los niveles de RNAm de algunas de las proteínas involucradas en el incremento de la fibrosis tisular asociada a la obesidad.

Los niveles de expresión de FN1 y Col1a1 se correlacionaron negativamente con los niveles transcripcionales de GLUT4 tanto en las ASC visceral como en las ASC subcutáneo (**Figura 5A**), pero solamente las ASC subcutáneo incrementaron significativamente los niveles del RNAm Col1a1 con el aumento del BMI y el HOMA-IR de los pacientes (**Figura 5B**).

Por otra parte, si bien no observamos diferencias significativas en los niveles de expresión de los receptores de la señalización TGF β , detectamos niveles de RNAm Smad7 significativamente elevados en las ASC subcutáneo de sujetos NoSM (**Figura 6A**). Además, el análisis por western blot nos permitió constatar un incremento significativo en los niveles proteico de Smad7 en la fracción citoplasmática de las ASC subcutáneo de los sujetos NoSM respecto a la de los sujetos SM (**Figura 6B**).

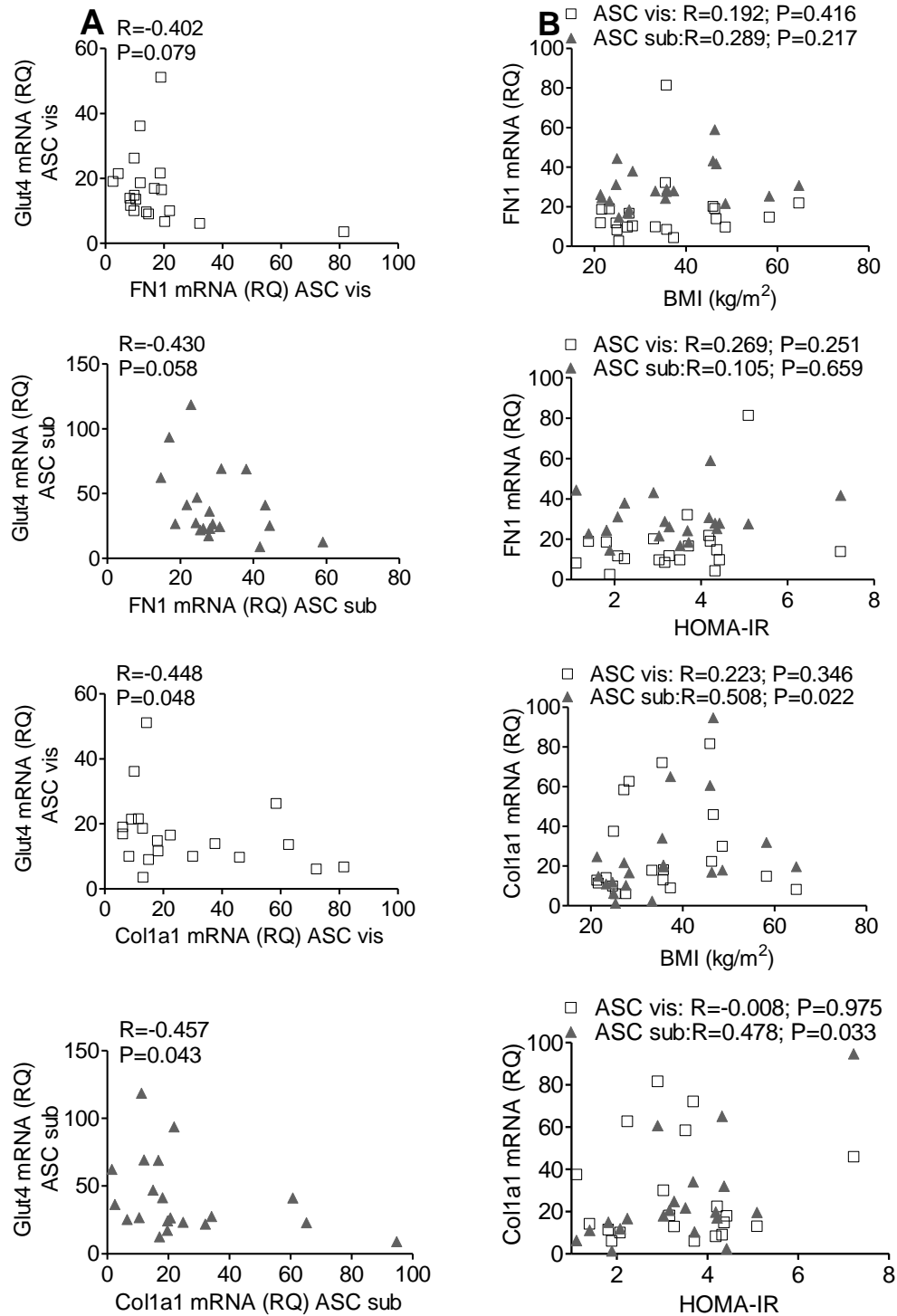


Figura 5. Niveles de expresión del RNAm Glut4 y proteínas asociadas a la fibrosis tisular adiposa. A: Correlación de los niveles de expresión del RNAm Glut4 con FN1 y Col1a1 en las ASCs de sujetos con perfiles metabólicos diferentes. **B:** Correlación de los niveles transcripcionales de FN1 y Col1a1 en las ASCs con el BMI y HOMA-IR de los sujetos. Los valores son registrados como media \pm error estándar (Np = 5; NoSM = 6; SM = 9).

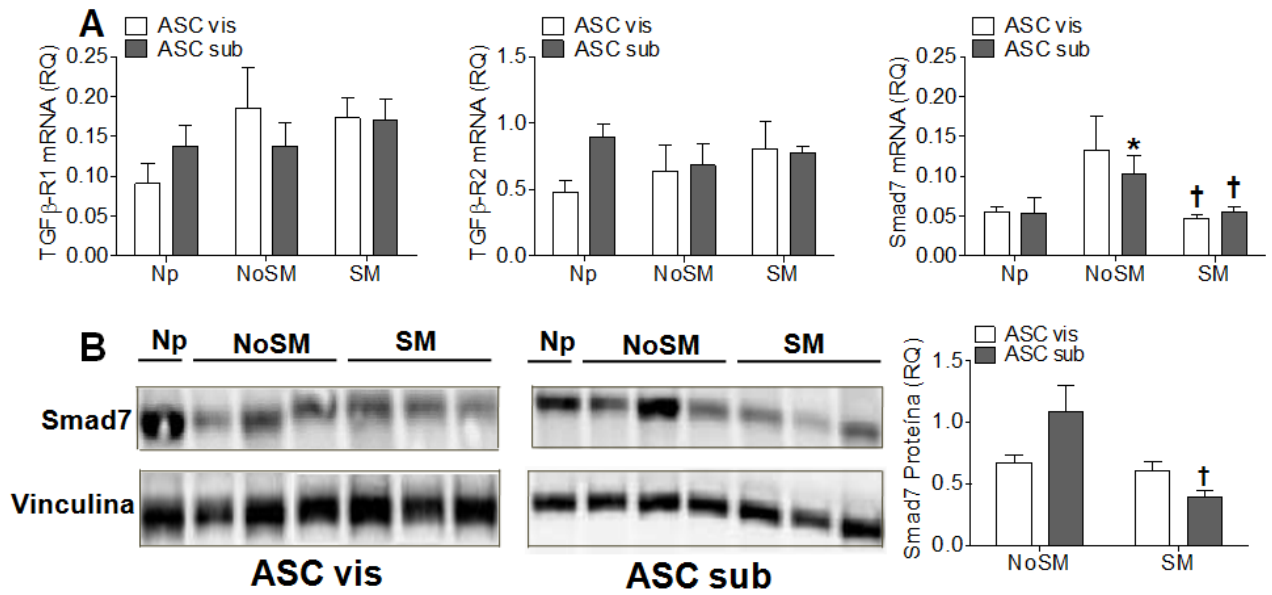


Figura 6. Expresión de proteínas involucradas en la señalización TGFβ.

A: Niveles de expresión del RNAm de componentes de la señalización TGFβ en las ASCs de sujetos agrupados según su perfil metabólico. Los valores son registrados como media \pm error estándar (Np = 5; NoSM = 6; SM = 9). **B:** Expresión de Smad7 detectada mediante western blot. 22 μ g de proteínas de la fracción citoplasmáticas de las ASCs de sujetos con diferentes perfiles metabólicos fueron cargadas a las respectivas calles de geles de poliacrilamida (7.5%), sometidas a electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes y transferidas hacia membranas PVDF. La gráfica representa los valores relativos de densidad óptica revelados mediante el marcaje específico contra Smad7 respecto a los del control de carga Vinculina. Los valores son registrados como media \pm error estándar (NoSM = 3; SM = 3). *, Resultados significativamente diferentes (Mann-Whitney; $P < 0.05$) al de los sujetos Np; †, resultados significativamente diferentes (Mann-Whitney; $P < 0.05$) al de los sujetos NoSM.

1.4-Menor susceptibilidad a la apoptosis, pero mayor tiempo de doblaje poblacional en las ASC de sujetos SM.

La remodelación tisular adiposa que tiene lugar durante la obesidad no sólo está acompañada por la síntesis desproporcionada de componentes de la matriz extracelular (Henegar *et al*, 2008), sino también por la disminución del número de adipocitos (van Harmelen *et al*, 2003; Pasarica *et al*, 2009). Debido a que los adipocitos son generados a partir de las células precursoras mesenquimales, es probable que la disminución de la disponibilidad de ASC contribuya a variaciones en la abundancia de los adipocitos durante la obesidad.

La **Figura 7A** muestra los efectos apoptóticos del medio libre de suero y del TNF α sobre las ASC visceral y subcutáneo de los dos grupos de pacientes obesos según el ensayo TUNEL. La evaluación por citometría de flujo reveló que las ASC visceral y subcutáneo de los sujetos NoSM tuvieron mayor porcentaje de células apoptóticas cuando fueron estimuladas con el TNF α , pero sólo las ASC visceral evidenciaron un incremento estadísticamente significativo respecto al de los sujetos SM (**Figura 7B**).

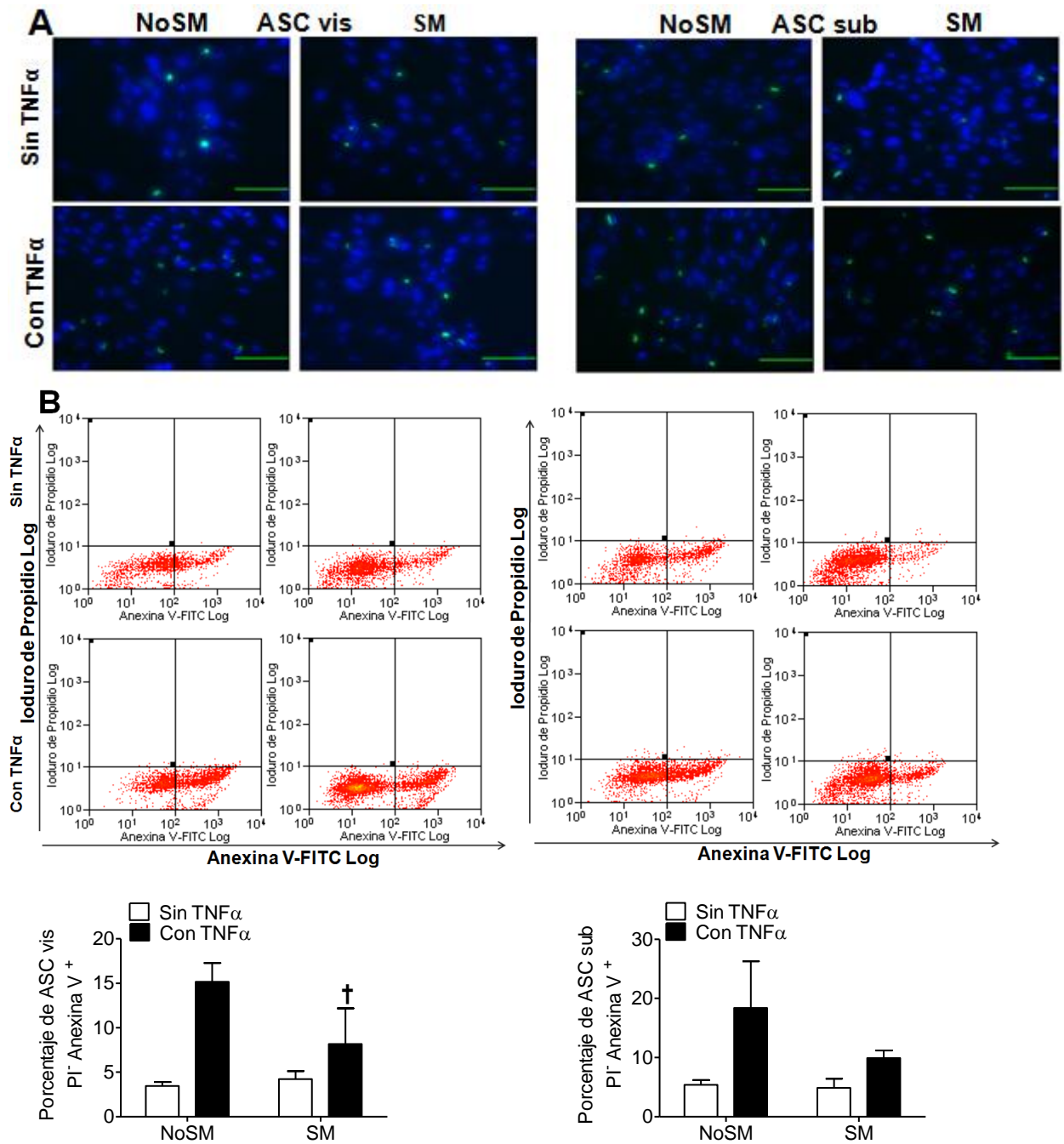


Figura 7. Inducción de la apoptosis celular en las ASC visceral y subcutáneo de sujetos obesos con perfiles metabólicos diferentes cultivadas durante 24 horas en medio libre de suero sin y con 100 ng/mL del TNF α . **A:** Confirmación de la apoptosis mediante la aplicación del ensayo TUNEL y el doble marcaje con DAPI (azul) y fluoresceína (verde) de las ASCs en apoptosis. Barra = 100 μ m. **B:** Cuantificación por citometría de flujo del porcentaje de ASCs que evidenciaron apoptosis temprana según el marcaje negativo para Ioduro de Propidio, pero positivo para anexina V conjugada a FITC. (NoSM = 4; SM = 6). [†], Resultados significativamente diferentes (Mann-Whitney; $P < 0.05$) al de los sujetos NoSM.

Mientras el tiempo de doblaje poblacional (PDT) de las ASC subcutáneo de los sujetos SM fue significativamente mayor que el de los sujetos Np y NoSM, la disminución del potencial proliferativo mostrado por las ASC visceral de los sujetos SM no alcanzó la significancia estadística (**Figura 8**). La **Figura 8** también muestra que el PDT de las ASCs de los pacientes incrementó con el empeoramiento de su perfil metabólico según el HOMA-IR, la concentración de glucosa y triglicéridos plasmáticos, fundamentalmente en las derivadas del tejido adiposo subcutáneo.

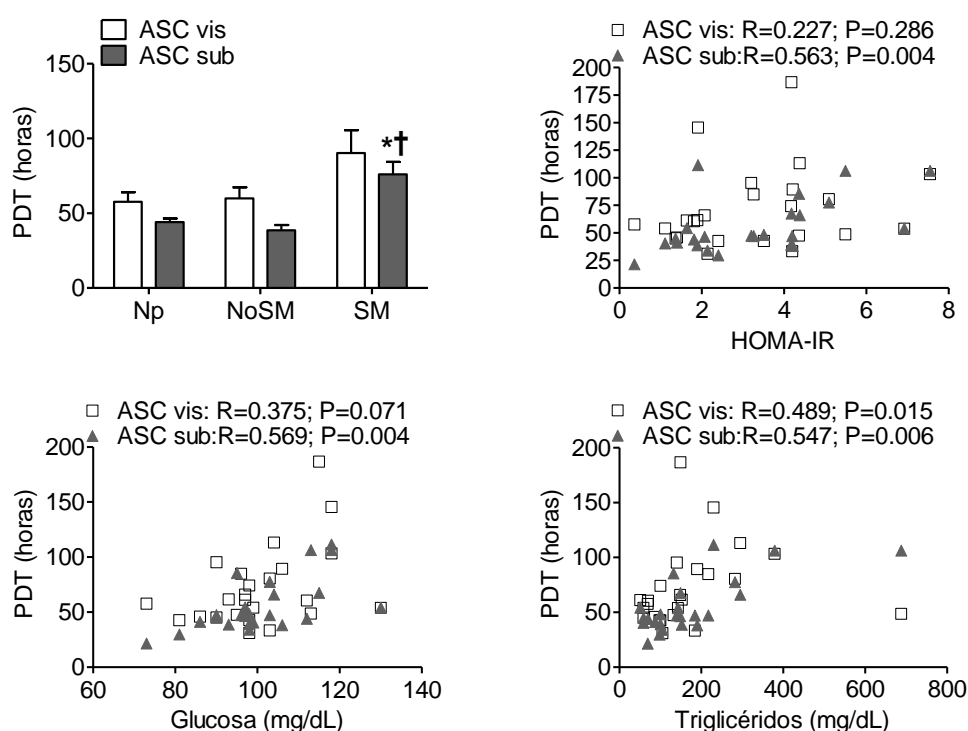


Figura 8. Tiempo de doblaje poblacional (PDT) de las ASC visceral y subcutáneo de sujetos normopesos y obesos con perfiles metabólicos diferentes. Las ASCs en pase dos fueron sembradas por duplicado a una densidad de 3 000 células/cm² en placas de doce pozos y el PDT fue calculado entre el sexto y octavo día de cultivo. (Np = 7; NoSM = 7; SM = 10).

*, Resultados significativamente diferentes (Mann-Whitney; $P < 0.05$) al de los sujetos Np; †, resultados significativamente diferentes (Mann-Whitney; $P < 0.05$) al de los sujetos NoSM. R, coeficiente Rho de Spearman.

1.5-Incremento del potencial clonogénico y de la concentración del FGF2 retenido en la superficie de las ASC subcutánea de los sujetos NoSM.

Teniendo en cuenta que experimentos *in vitro* han demostrado que la señalización autocrina asociada al FGF2 incrementa la tasa de proliferación y el potencial clonogénico de las ASCs (Zaragosi *et al*, 2006; Rider *et al*, 2008), creemos que las cantidades del FGF2 retenidas en la superficie celular de las ASC derivadas de sujetos SM y NoSM podrían ser diferentes.

La aplicación del ELISA en la solución de lavado recolectada reveló que la concentración del FGF2 retenida por las ASC visceral y subcutáneo disminuyó significativamente con el incremento del HOMA-IR (**Figura 9A**) y los niveles de glucosa plasmática respectivamente (**Figura 9B**). Además, detectamos un incremento relevante en la concentración del FGF2 retenido por las ASC subcutáneo derivadas de sujetos NoSM respecto a los otros dos grupos de pacientes (**Figura 9C**).

La tinción con cristal violeta facilitó el recuento de colonias generadas durante 14 días por el cultivo a baja densidad de las ASCs (**Figura 9D**). La **Figura 9E** muestra que el número de colonias generadas por las ASC visceral y subcutáneo de los sujetos SM fue significativamente inferior al observado en los sujetos Np. Aunque el número de colonias de las ASC subcutáneo se correlacionó negativamente de forma significativa con el BMI (**Figura 9F**) y el HOMA-IR de los pacientes (**Figura 9G**), el potencial clonogénico de las ASC subcutáneo de los sujetos NoSM fue significativamente superior al de los sujetos SM y no difirió significativamente del de los sujetos Np (**Figura 9E**).

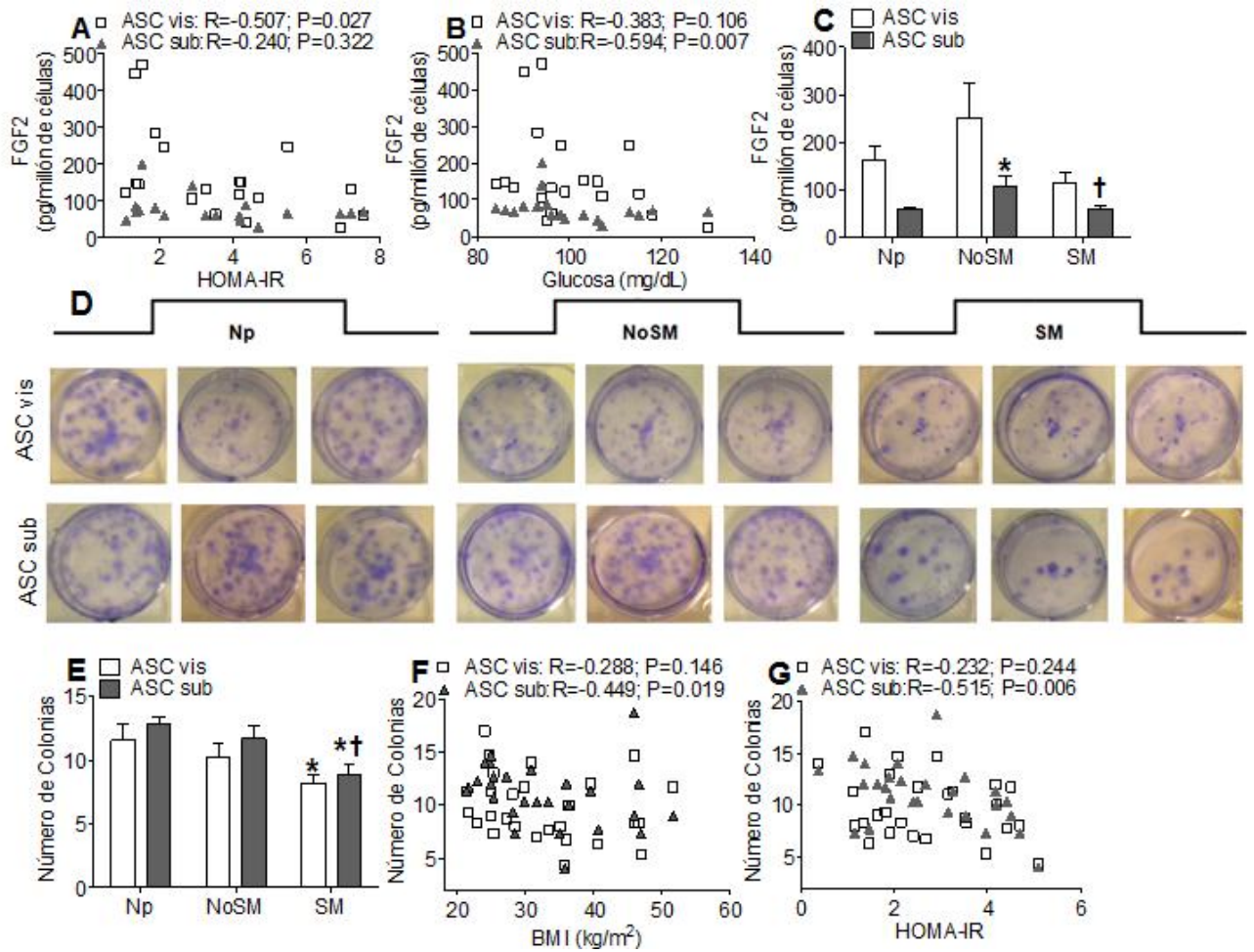


Figura 9. Potencial clonogénico y retención del FGF2 en la superficie de las ASC visceral y subcutáneo. **A-C:** Correlación de la concentración del FGF2 exportado hacia la superficie de las ASCs con el HOMA-IR (**A**) y la concentración de glucosa plasmática de los pacientes (**B**). Valores de concentración del FGF2 retenido en la superficie de las ASCs de sujetos agrupados según su perfil metabólico (**C**). (Np = 4; NoSM = 6; SM = 9). **D:** Tinción con solución de cristal violeta de las colonias generadas por las ASCs sembradas a baja densidad y cultivadas bajo condiciones estándares durante 14 días en placas de seis pozos. **E-G:** Número de colonias observadas en las ASCs de los diferentes grupos de pacientes (**E**), correlación del número de colonias con el BMI (**F**) y el HOMA-IR de los pacientes (**G**). (Np = 7; NoSM = 10; SM = 10). *, Resultados significativamente diferentes (Mann-Whitney; $P < 0.05$) al de los sujetos Np; †, resultados significativamente diferentes (Mann-Whitney; $P < 0.05$) al de los sujetos NoSM.

2-Contribución de las ASC Visceral y Subcutáneo a la Disminución de la Capacidad Angiogénica del Tejido Adiposo.

2.1-Disminución de la capacidad de formación de túbulos e incremento de los niveles de expresión de NADPH oxidasa en las ASC visceral y subcutáneo de sujetos SM.

Debido a la implicación del FGF2 en la formación de capilares (Kanda *et al*, 2003), es probable que el FGF2 retenido por las ASCs no sólo repercuta en su potencial proliferativo y clonogénico sino también en su capacidad de formación de túbulos. De hecho, la densidad de vasos sanguíneos del tejido adiposo se ha visto correlacionada positivamente con el número de colonias generadas por las ASCs aisladas del propio tejido (da Silva *et al*, 2009).

El ensayo de formación de túbulos en matrigel empobrecido en factores de crecimiento confirmó la propiedad de las ASC visceral y subcutáneo de generar estructuras semejantes a capilares (**Figura 10A**) y reveló una correlación positiva estadísticamente significativa entre la longitud de túbulos generados por las ASC de ambos depósitos adiposos. (**Figura 10B**). No observamos diferencias significativas entre la longitud de las estructuras semejantes a capilares generadas por las ASCs de los sujetos obesos y Np. Sin embargo, tanto las ASC visceral como las ASC subcutáneo de los sujetos SM evidenciaron una disminución estadísticamente significativa de la capacidad de formación de túbulos respecto a la de los sujetos NoSM (**Figura 10C**).

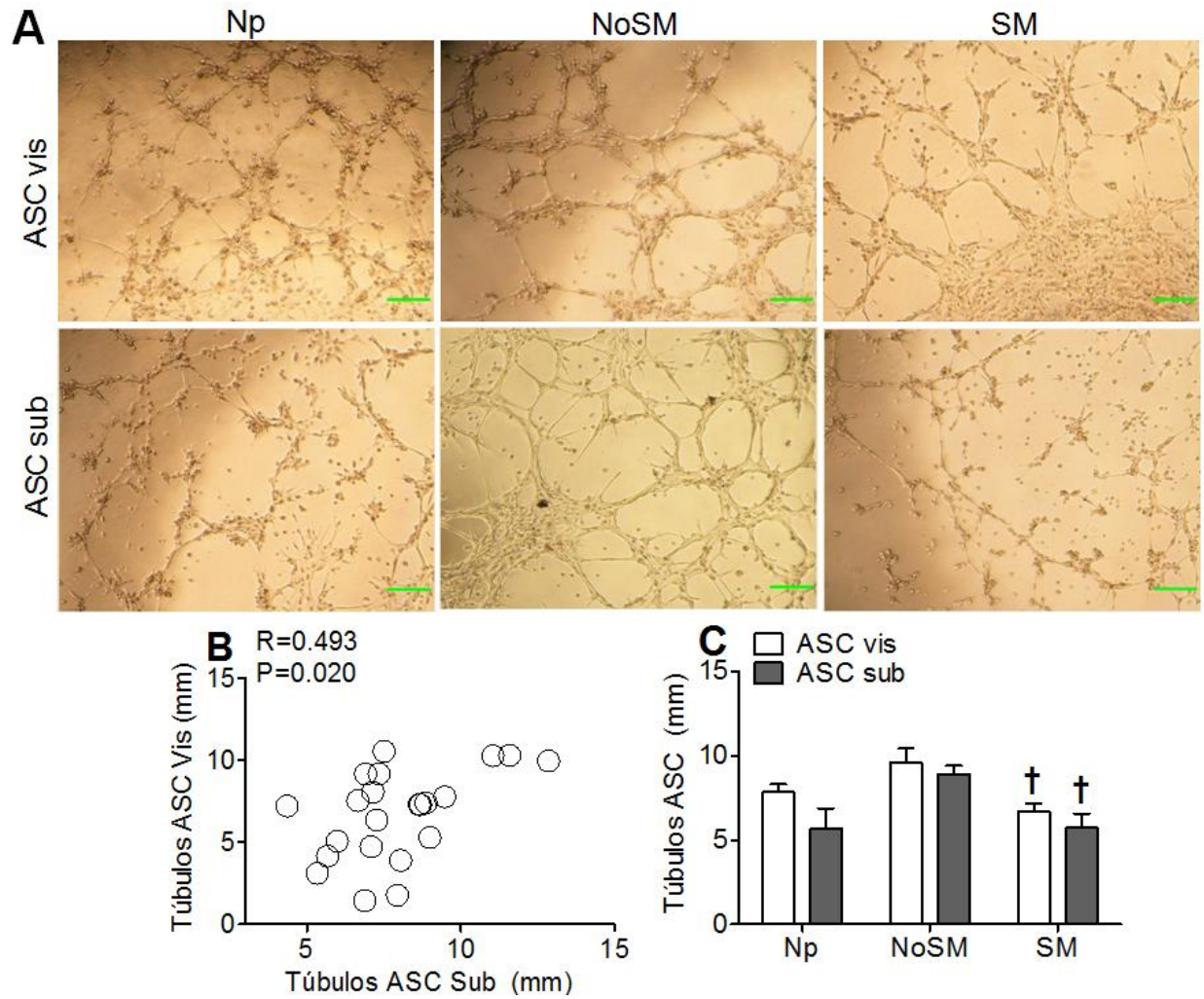


Figura 10. Capacidad de formación de túbulos por las ASC visceral y subcutáneo. **A:** Generación de estructuras semejantes a capilares por las ASCs cultivadas bajo condiciones estándares durante seis horas en placas de 48 pozos recubiertas con $50 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ de matrigel empobrecido en factores de crecimiento. Barra = $250 \mu\text{m}$. **B:** Correlación entre la longitud de estructuras tubulares generadas por las ASCs de ambos tejidos. **C:** Valores de longitud de túbulos generados por las ASCs de sujetos agrupados según su perfil metabólico. (Np = 6; NoSM = 7; SM = 9). †, Resultados significativamente diferentes (Mann-Whitney; $P < 0.05$) al de los sujetos NoSM.

Experimentos *in vitro* e *in vivo* han demostrado que las células precursoras tratadas con oxidantes disminuyen su capacidad de formar túbulos (Ingram *et al*, 2007), sugiriendo que el estrés oxidativo podría afectar sus propiedades neovasculares. Teniendo en consideración que el estrés oxidativo está estrechamente vinculado al síndrome metabólico (Bashan *et al*, 2009) y como ha sido demostrado que NADPH oxidasa es una de las principales fuentes de producción de ROS en el tejido adiposo de sujetos obesos (Furukawa *et al*, 2004), examinamos los niveles de expresión de varios miembros de la familia NADPH oxidasa.

Observamos correlaciones estadísticamente significativas entre los niveles de expresión de NOX5 en las ASC visceral (**Figura 11A**) y NOX4 en las ASC subcutáneo (**Figura 11B**) con variables que describen el perfil lipídico de los sujetos.

La aplicación de la técnica qPCR también nos permitió corroborar que tanto las ASC visceral como las ASC subcutáneo de los sujetos obesos evidenciaron un incremento de los RNAm NOX5 y NOX4. En particular, los niveles de expresión de NOX4 en las ASC subcutáneo de los sujetos SM fueron significativamente elevados respecto a los sujetos Np (**Figura 11C**).

Seguidamente evaluamos la expresión de enzimas antioxidantes involucradas en catalizar la dismutación del superóxido derivado de la actividad NADPH oxidasa. Observamos una asociación positiva entre los niveles transcripcionales de SOD1 y SOD3 con el RNAm NOX4 expresado por las ASC derivadas de ambos tejidos, que sólo fue estadísticamente relevante para las ASC subcutáneo (**Figura 11D**).

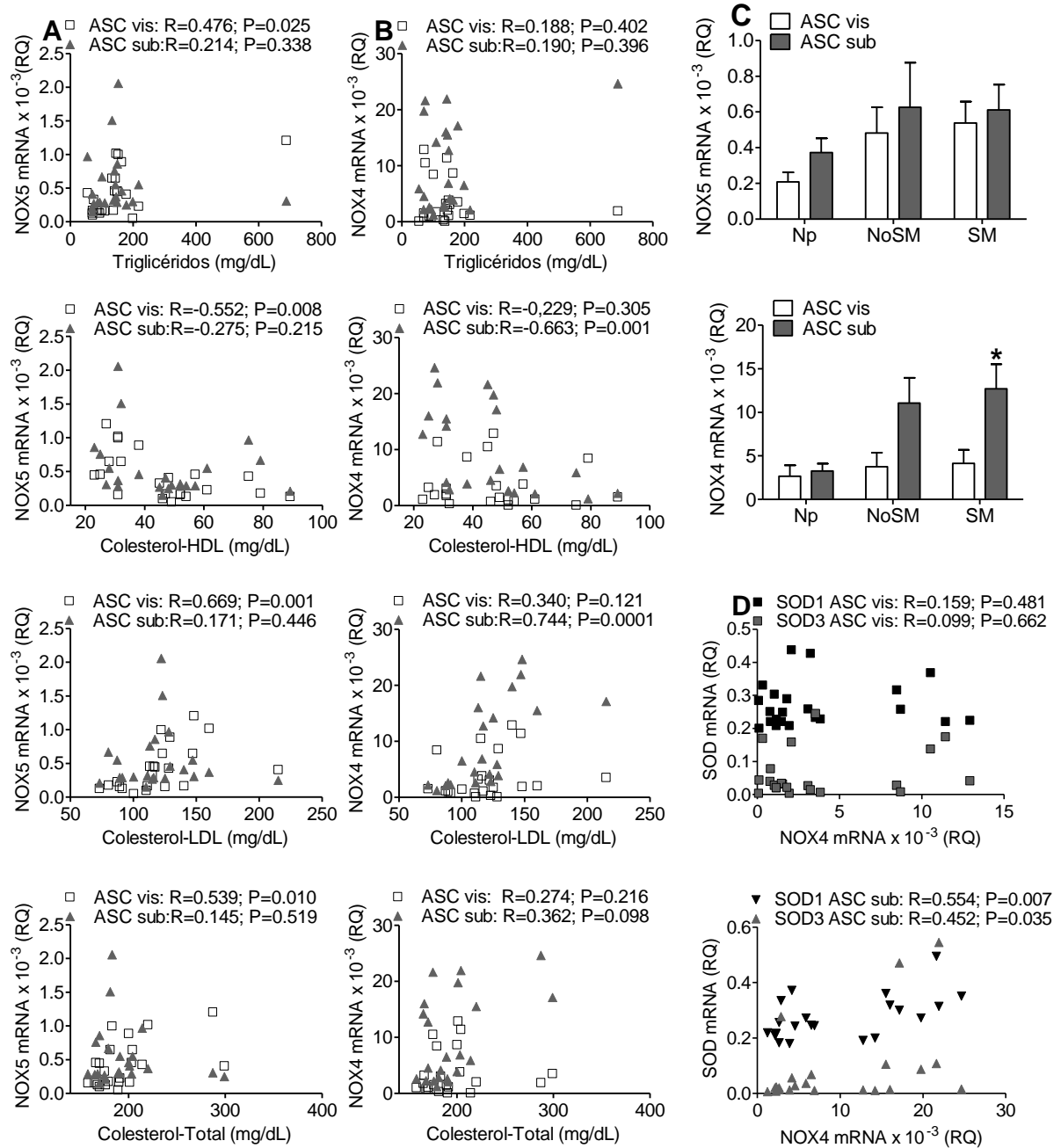


Figura 11. Expresión de proteínas involucradas en el balance redox celular en las ASC visceral y subcutáneo. A-B: Correlación de los niveles transcripcionales del RNAm NOX5 (**A**) y NOX4 (**B**) con variables que describen el perfil metabólico de los pacientes. **C:** Niveles de expresión del RNAm NOX5 y NOX4 en las ASCs de sujetos agrupados según su perfil metabólico. **D:** Correlación de los niveles de expresión del RNAm NOX4 con SOD1 y SOD3 tanto en las ASC visceral como en las ASC subcutáneo. (Np = 6; NoSM = 7; SM = 9). *, Resultados significativamente diferentes (Mann-Whitney; $P < 0.05$) al de los sujetos Np.

2.2-Disminución de los niveles de secreción del VEGF por las ASC subcutáneo de los sujetos SM durante la diferenciación adipogénica.

Técnicas de microscopía *in vivo* han revelado que la diferenciación adipogénica de los preadipocitos implantados está acompañada por la formación de nuevos vasos sanguíneos (Fukumura *et al*, 2003) e interacciones entre múltiples tipos celulares que favorecen el acoplamiento entre la adipogénesis y la angiogénesis (Nishimura *et al*, 2007). Sin embargo, también ha sido admitido que durante la adipogénesis se generan ROS que interactúan con la propia diferenciación de los preadipocitos (Gummersbach *et al*, 2009).

Creemos que el estrés oxidativo asociado a la obesidad (Furukawa *et al*, 2004) no sólo podría afectar la capacidad de formación de túbulos por las ASCs sino también la secreción de citoquinas implicadas en la neovascularización adipogénica. Para corroborar ésta hipótesis cultivamos las ASCs en medio adipogénico durante seis días y recolectamos el medio de cultivo condicionado por las ASC visceral y subcutáneo durante las últimas 72 horas.

Después de seis días en medio adipogénico, confirmamos la acumulación citoplasmática de lípidos mediante el marcaje fluorescente con solución Rojo Nilo (**Figura 12A**). Como se puede apreciar en la **Figura 12B**, las ASC visceral y subcutáneo cultivadas en medio adipogénico incrementaron los niveles de expresión de los factores transcripcionales C/EBP α y PPAR γ respecto a las cultivadas en medio no adipogénico pero sin existir diferencias significativas entre los grupos de sujetos.

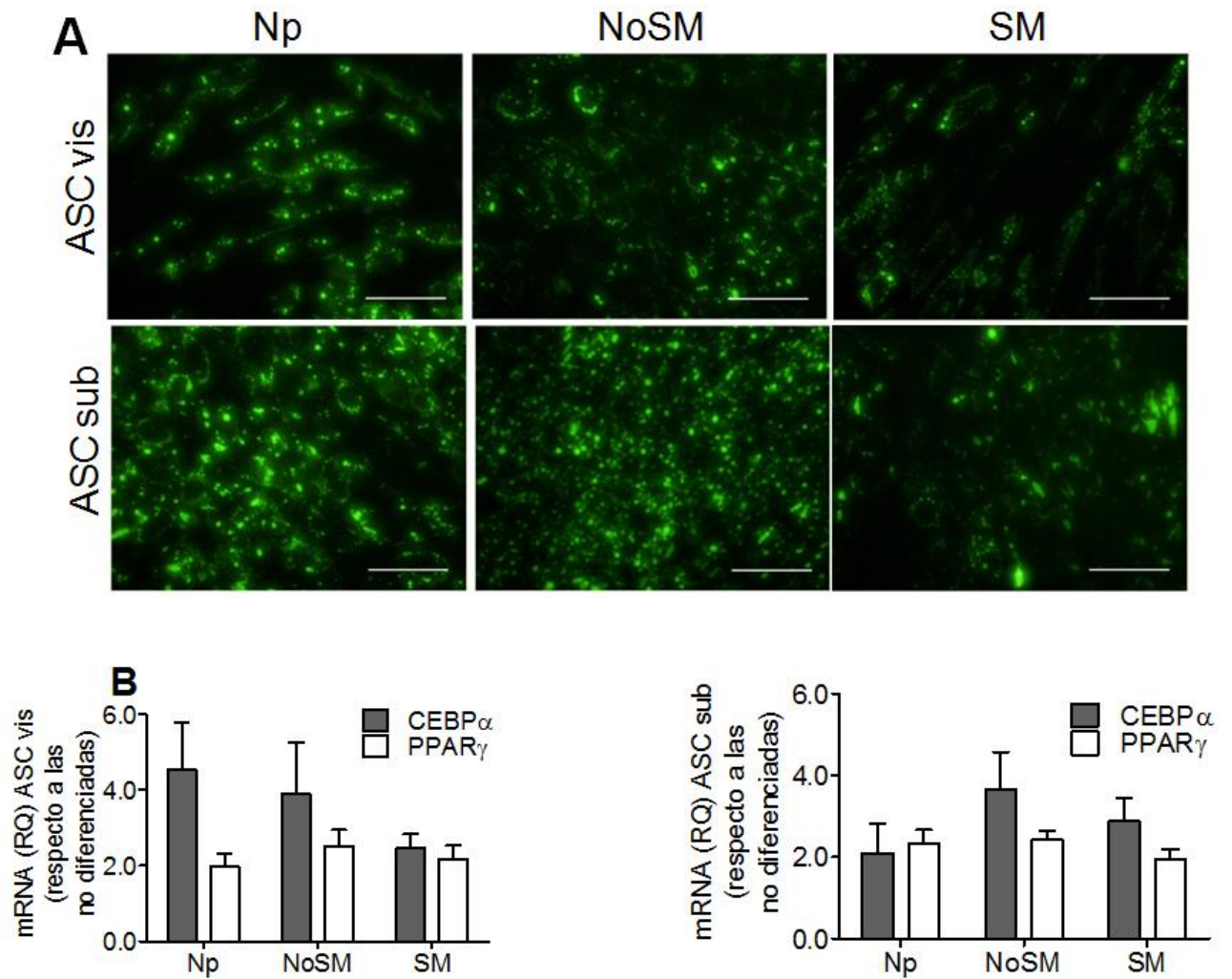


Figura 12. Diferenciación adipogénica de las ASC visceral y subcutáneo durante seis días. A: Marcaje con AdipoRed de los lípidos acumulados en el citoplasma de las ASCs después de seis días de cultivo en medio adipogénico. Barra = 100 μ m. **B:** Niveles de expresión del RNAm CEBP α y PPAR γ en las ASCs de sujetos agrupados según su perfil metabólico. Los valores del RNAm CEBP α y PPAR γ fueron determinados por qPCR y normalizados respecto al RNAm RPL13A. (Np = 4; NoSM = 5; SM = 8).

La cantidad secretada del VEGF a los seis días de diferenciación adipogénica por las ASC de ambos tejidos se correlacionó negativamente con el BMI (**Figura 13A**) y la concentración del Colesterol-LDL plasmático (**Figura 13B**), pero sólo los niveles secretados por las ASC subcutáneo revelaron una correlación estadísticamente significativa. Cuando comparamos con los sujetos Np, solamente las ASC subcutáneo de los sujetos SM disminuyeron significativamente la concentración del VEGF secretada hacia el medio de cultivo adipogénico (**Figura 13C**).

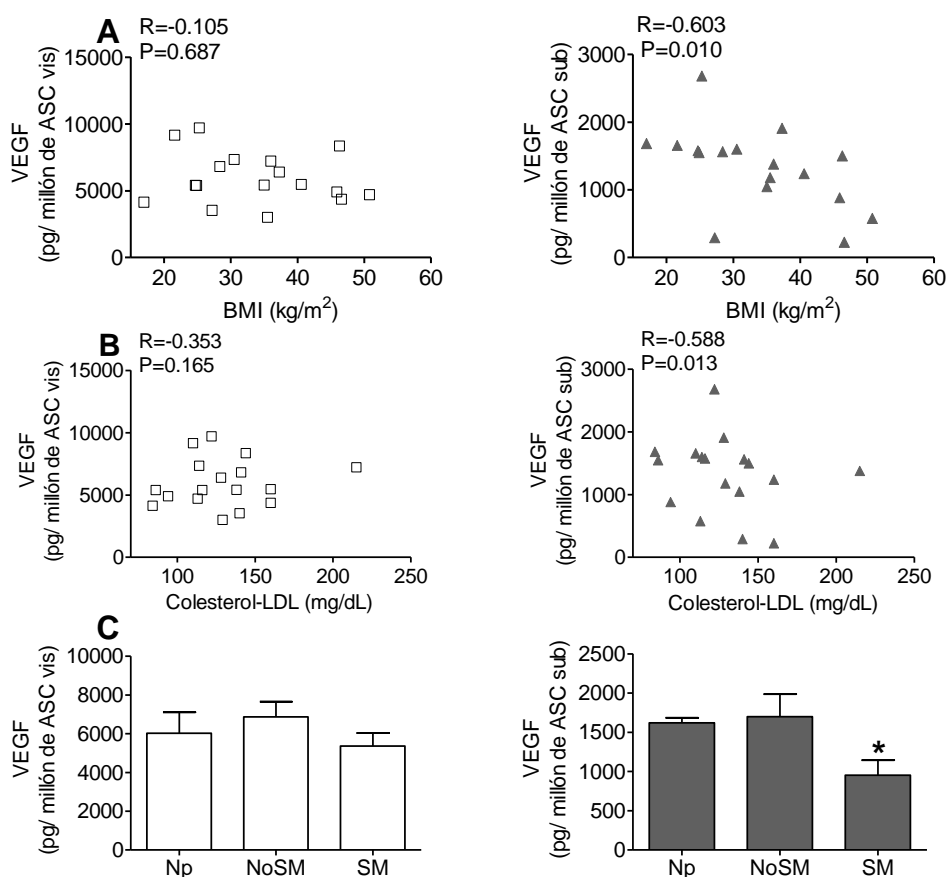


Figura 13. Concentración del VEGF en el medio adipogénico condicionado por las ASC visceral y subcutáneo. Los niveles del VEGF secretados por las ASCs durante las últimas 72 horas de los seis días de diferenciación adipogénica fueron cuantificados mediante ELISA y normalizados respecto a 1×10^6 ASCs según el número de células presentes en el momento de recolección del medio. (Np = 4; NoSM = 5; SM = 8). *, Resultados significativamente diferentes (Mann-Whitney; $P < 0.05$) al de los sujetos Np.

Contrario al VEGF, la concentración del HGF tendió a ser mayor en el medio adipogénico condicionado por las ASC visceral y subcutáneo de los dos grupos de sujetos obesos (**Figura 14A**). De hecho, sus niveles de secreción ascendieron significativamente en las ASC visceral con el aumento del BMI de los pacientes (**Figura 14B**) y en las ASC subcutáneo con el incremento de la concentración de triglicéridos plasmáticos. (**Figura 14C**).

Relevantemente, observamos una asociación negativa entre los niveles de secreción de ambas citoquinas por las ASCs de los respectivos tejidos, cuya significancia estadística es alcanzada solamente por las ASC visceral (**Figura 14D**).

2.3-Incremento transcripcional de citoquinas inflamatorias durante la diferenciación adipogénica de las ASC subcutáneo de los sujetos SM

Ha quedado ampliamente establecido que el desbalance redox puede influir sobre la señalización NF- κ B implicada en la activación transcripcional de citoquinas inflamatorias (Morgan y Liu, 2011) y en la senescencia tisular adiposa vinculada a la obesidad (Minamino *et al*, 2009). Por ello, seguidamente evaluamos los niveles de expresión de algunas citoquinas que forman parte del fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP).

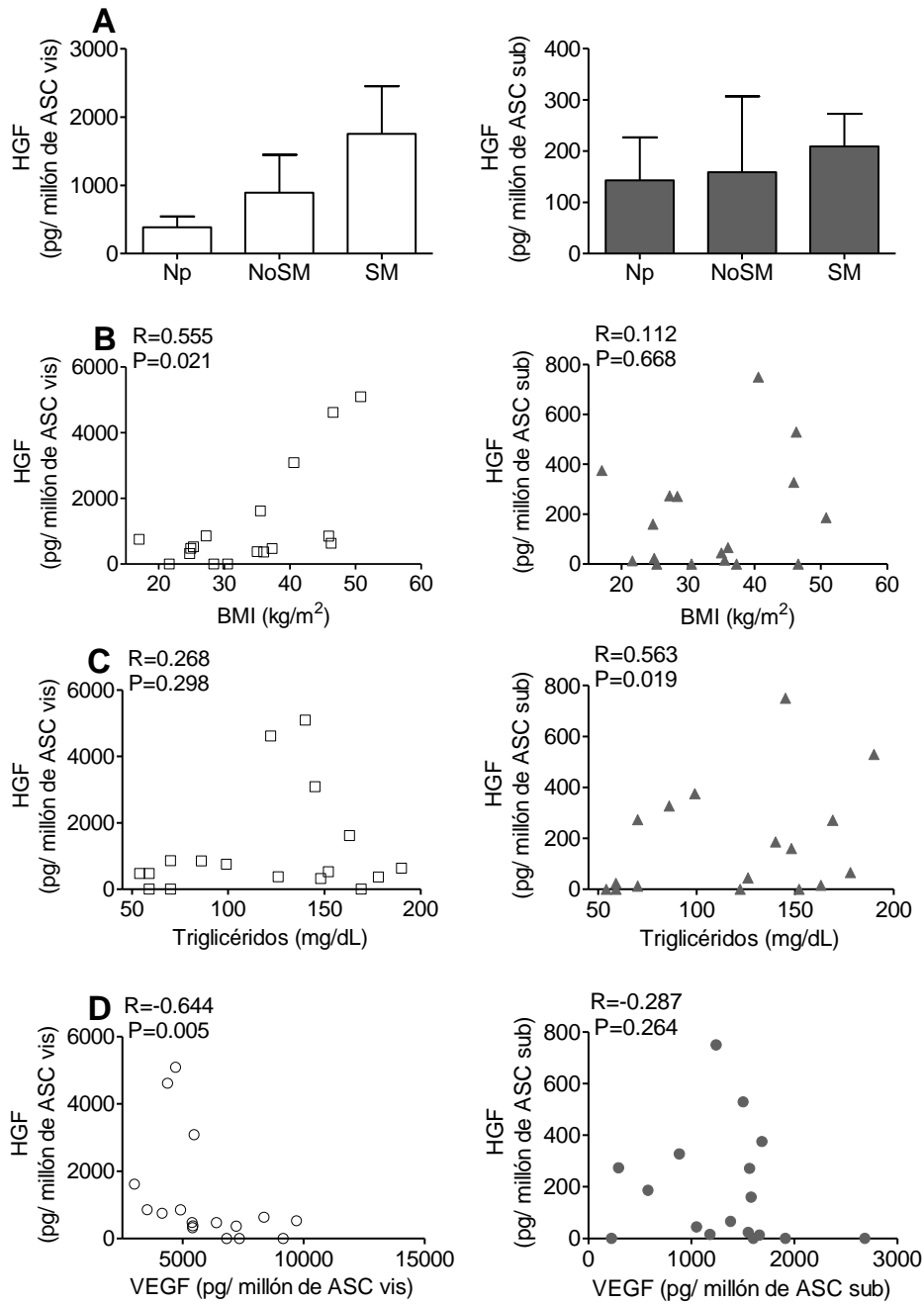


Figura 14. Concentración del HGF en el medio adipogénico condicionado por las ASC visceral y subcutáneo. Los niveles del HGF secretados por las ASCs durante las últimas 72 horas de los seis días de diferenciación adipogénica fueron cuantificados mediante ELISA y normalizados respecto a 1×10^6 ASCs según el número de células presentes en el momento de recolección del medio. (Np = 4; NoSM = 5; SM = 8).

Los mayores valores de expresión de RNAm IL1 β , IL8 y MCP1 fueron observados tanto en las ASC visceral como en las ASC subcutáneo de los sujetos SM, pero sin alcanzar la significancia estadística (**Figura 15A**). Aunque observamos una correlación positiva entre la concentración de glucosa plasmática y los niveles de expresión de dichas citoquinas en las ASC visceral (**Figura 15B**), sólo en las ASC subcutáneo detectamos una correlación positiva estadísticamente significativa (**Figura 15C**).

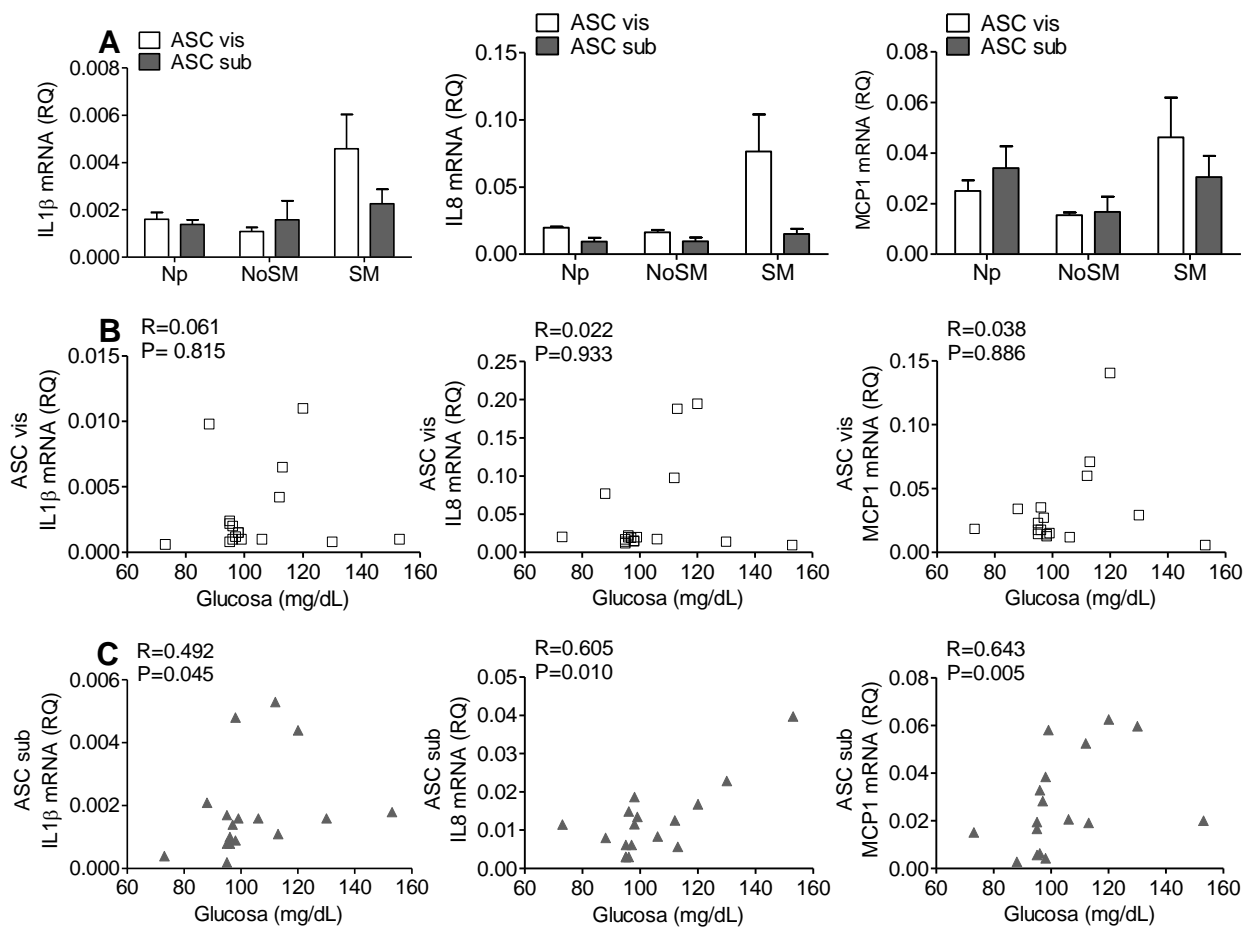


Figura 15. Expresión de citoquinas inflamatorias por las ASC visceral y subcutáneo. A-C: Expresión del RNAm de citoquinas inflamatorias en las ASCs de sujetos agrupados según su perfil metabólico (**A**) y correlación con la concentración de glucosa plasmática tanto en las ASC visceral (**B**) como en las ASC subcutáneo (**C**). Los niveles de RNAm de la IL1 β , IL8, MCP1 expresados por las ASCs a los seis días de diferenciación adipogénica fueron determinados mediante qPCR y normalizados respecto al RNAm RPL13A. (Np = 4; NoSM = 5; SM = 8).

2.4-Efectos del medio de cultivo condicionado por las ASC visceral y subcutáneo sobre la supervivencia y tubulogénesis de células endoteliales.

Teniendo en consideración que la acción paracrina es uno de los mecanismos implicados en la función neovascular de las ASCs, es probable que las variaciones en la concentración de citoquinas secretadas por las ASCs de sujetos obesos con perfiles metabólicos diferentes repercutan sobre el comportamiento de las células endoteliales. Para verificar esto, evaluamos la supervivencia y la formación de túbulos por las HUVECs cultivadas en los respectivos medios condicionados por las ASCs.

No detectamos diferencias significativas en la supervivencia de las HUVECs (**Figura 16A**), pero la tasa de incremento en la formación de túbulos por las HUVECs cultivadas en el medio condicionado por las ASC subcutáneo de sujetos SM disminuyó significativamente respecto a la observada en las cultivadas en el medio condicionado por las ASC subcutáneo de los pacientes NoSM (**Figura 16B**) y tendió a correlacionarse negativamente con la concentración de colesterol-LDL de los pacientes (**Figura 16C**).

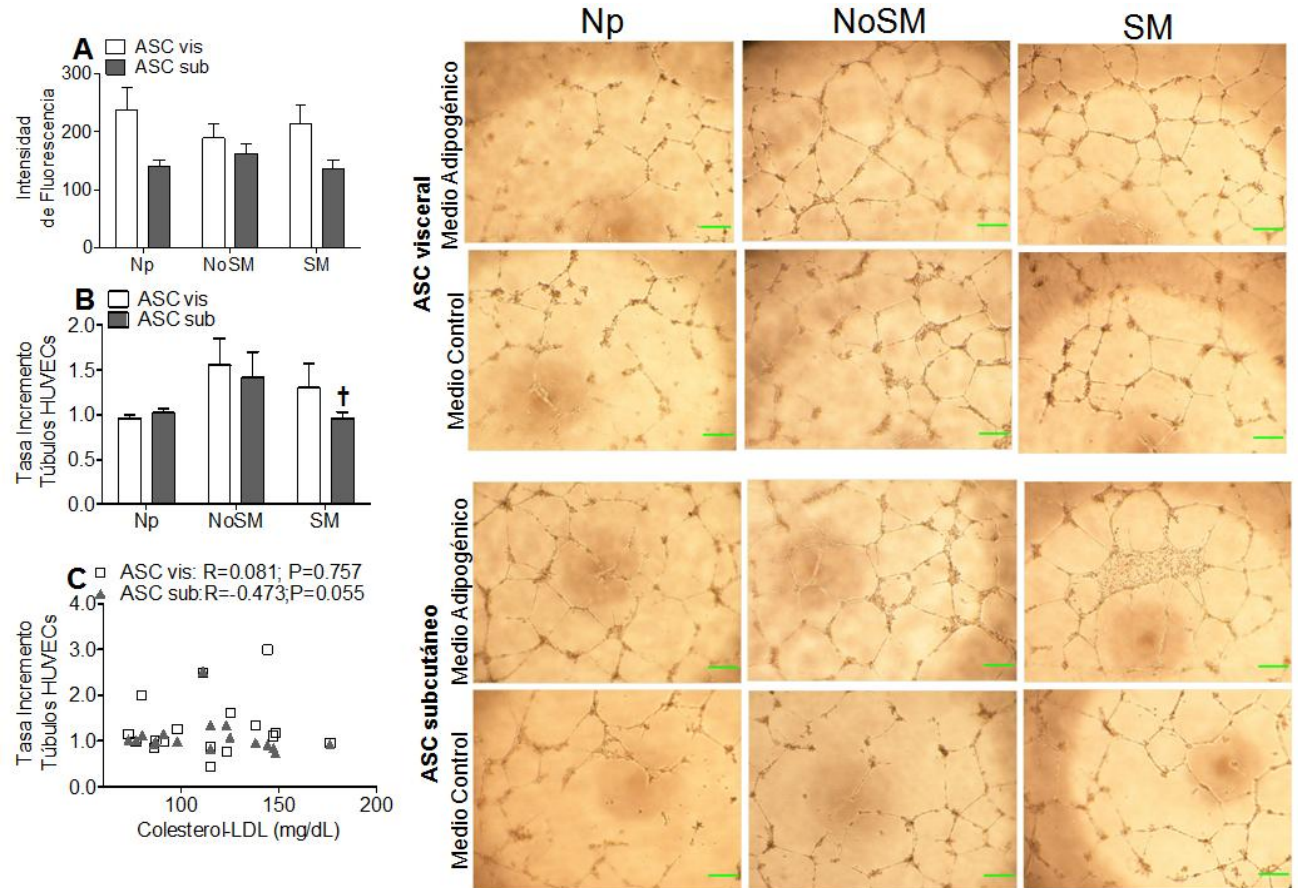


Figura 16. Bioactividad del medio condicionado adipogénico por las ASC visceral y subcutáneo. **A:** Fluorescencia emitida por la HUVECs que sobrevivieron después de 72 horas de cultivo en medio adipogénico condicionado por las ASCs respecto a las que sobrevivieron en medio adipogénico no condicionado. **B:** Estructuras tubulares y tasa de incremento de la longitud de túbulo generados por las HUVECs cultivadas durante 24 horas en medio adipogénico condicionado por las ASCs respecto a las generadas en medio control (no adipogénico) condicionado por las ASCs. Barra = 250 μ m. **C:** Correlación entre la tasa de incremento de túbulo generados por las HUVECs en medio condicionado por las ASCs y la concentración de colesterol-HDL plasmático de los pacientes. (Np = 4; NoSM = 5; SM = 8). †, Resultados significativamente diferentes (Mann-Whitney; $P < 0.05$) al de los sujetos NoSM.

3-Efectos de la Hipoxia sobre la Respuesta Neovascular e Inflamatoria de las ASC Visceral según el Perfil Metabólico de los Sujetos.

3.1-Capacidad de formación de túbulos y niveles de secreción del VEGF y HGF en las ASC visceral bajo condiciones de hipoxia.

Ha quedado ampliamente establecido el potencial que tienen las ASCs de contribuir a la neovascularización bajo condiciones de hipoxia. Debido a que las variaciones en su capacidad de respuesta neovascular hipóxica también podrían influir en la expansión adiposa dependiente de la angiogénesis, nuestro siguiente paso fue examinar la funcionalidad neovascular de las ASC bajo condiciones de hipoxia.

La exposición de las ASC visceral a seis horas de cultivo bajo 1 % de O_2 (g) reveló un incremento estadísticamente significativo en la longitud de túbulos generados por las ASC visceral de sujetos NoSM respecto a los formados por las ASC visceral de los otros dos grupos de sujetos (**Figura 17A**). A pesar de que no detectamos diferencias significativas en las cantidades del VEGF y del HGF secretadas por las ASC visceral cultivadas durante 72 horas bajo 1 % de O_2 (g) (**Figura 17B**), los valores de concentración del VEGF presentes en el medio de cultivo condicionado por las ASC visceral disminuyeron significativamente con el incremento de los niveles de glucosa plasmática de los pacientes (**Figura 17C**).

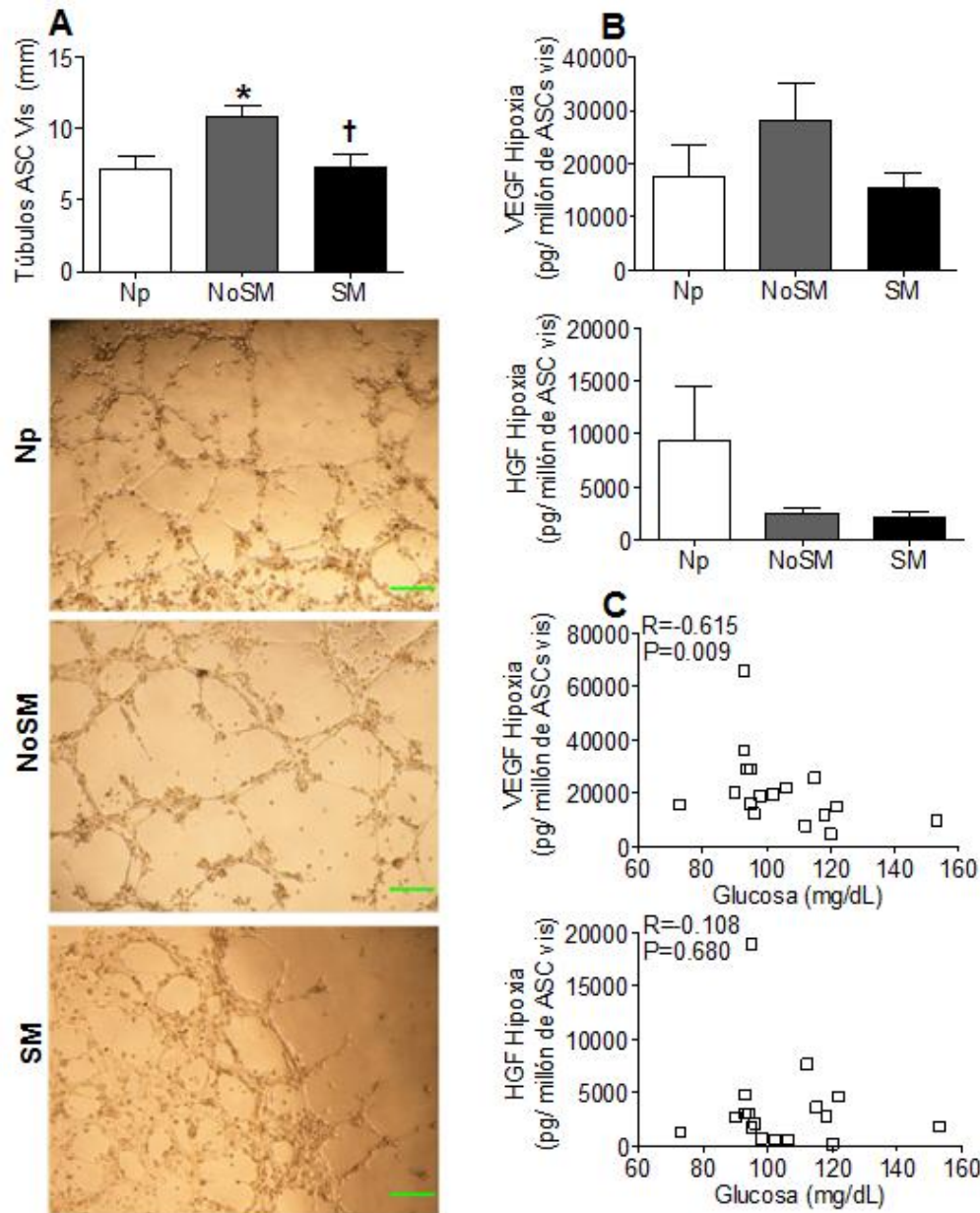


Figura 17. Capacidad de formación de túbulos y secreción de citoquinas angiogénicas por las ASC visceral expuestas a hipoxia. A: Estructuras tubulares y longitud media de túbulos generados por las ASC visceral sometidas a seis horas bajo 1 % O_2 (g). Barra = 250 μ m. **B-C:** Secreción del VEGF y HGF por las ASC visceral cultivadas durante 72 horas bajo 1 % O_2 (g) según el perfil metabólico de los sujetos (**B**) y el análisis de correlación de las concentraciones de las respectivas citoquinas con la concentración de glucosa plasmática de los pacientes (**C**). Las concentraciones de las citoquinas fueron determinadas por ELISAs y sus valores normalizados respecto a 1×10^6 ASC visceral según el número de células presentes en el momento de recolección del medio. (Np = 3; NoSM = 7; SM = 7). *, Resultados significativamente diferentes (Mann-Whitney; $P < 0.05$) al de los sujetos Np; †, resultados significativamente diferentes (Mann-Whitney; $P < 0.05$) al de los sujetos NoSM.

3.2-Las ASC visceral de sujetos SM mostraron un incremento del porcentaje de células CD140b⁺ y de la capacidad de migración bajo condiciones de hipoxia.

La caracterización inmunofenotípica de las ASC visceral cultivadas durante 72 horas bajo condiciones de normoxia e hipoxia reveló un incremento estadísticamente significativo del porcentaje de ASC visceral CD140b⁺ hipóxicas de sujetos SM respecto al de los sujetos NoSM (**Figura 18A**).

Comparadas con las ASC visceral de los sujetos NoSM cultivadas bajo hipoxia, las de los sujetos SM también evidenciaron un mayor porcentaje de células que coexpresan CD140b/CD44 y CD140b/CD184 (**Figura 18B**). Además, observamos que el porcentaje de ASC visceral cultivadas bajo hipoxia que coexpresan CD140b/CD44 y CD140b/CD184 se incrementó con el empeoramiento del perfil lipídico de los pacientes (**Figura 18C**).

Seguidamente se permitió que las ASC visceral cultivadas previamente bajo condiciones de normoxia o hipoxia migraran durante 24 horas bajo los efectos de la quimioquina SDF1 α , ligando del receptor CD184. Acorde a los porcentajes de ASC visceral CD184⁺ descritos por citometría de flujo, el número de ASC visceral atraídas por el SDF1 α hacia la superficie inferior de la cámara migratoria fue mayor en los sujetos SM (**Figura 19A**). De éste modo, la tasa migratoria de las ASC visceral de los sujetos SM cultivadas bajo hipoxia fue significativamente mayor que la registrada para las ASC visceral de los sujetos NoSM (**Figura 19B**).

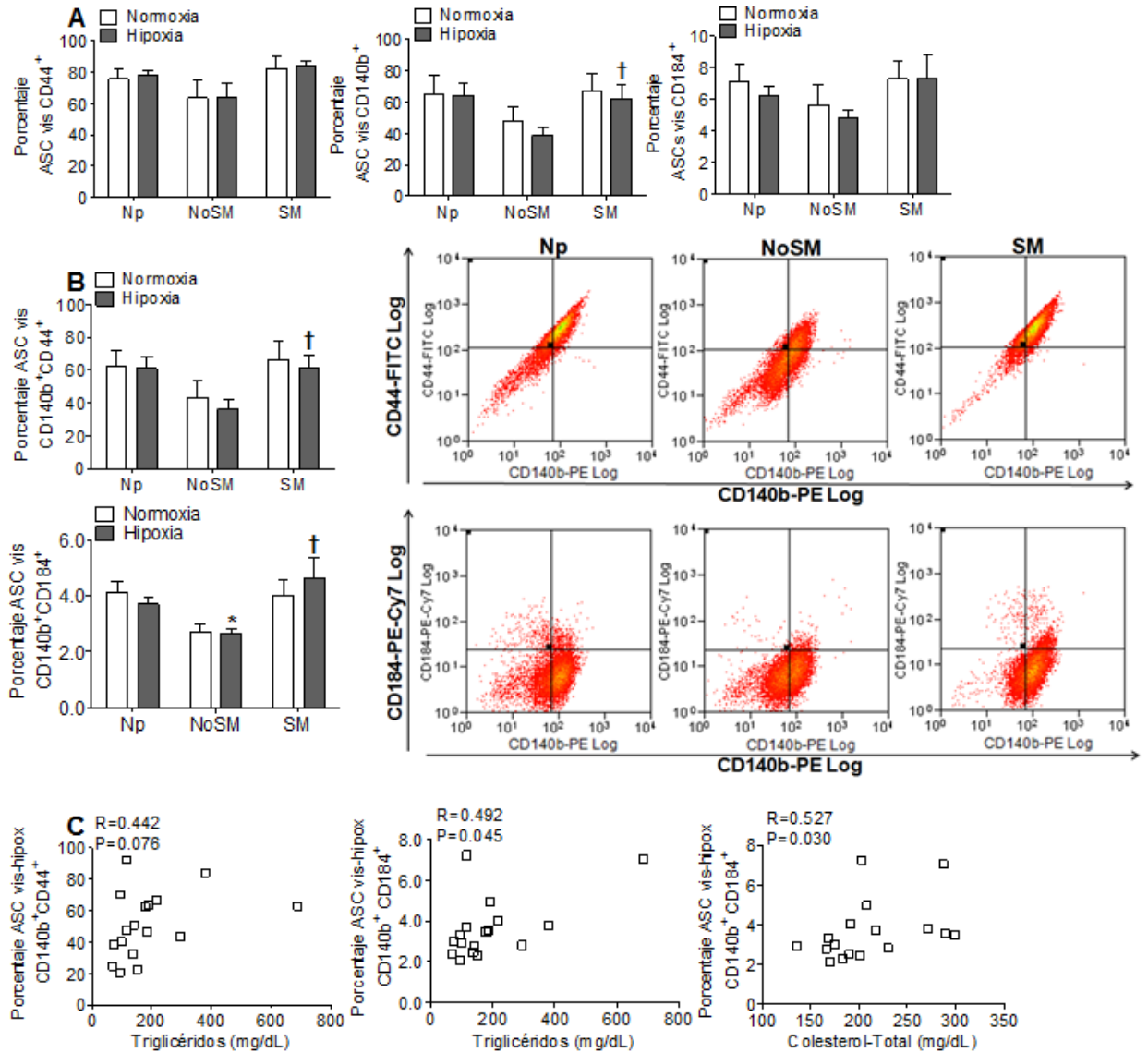


Figura 18. Caracterización inmunofenotípica de las ASC visceral cultivadas durante 72 horas bajo condiciones de normoxia (21 % O₂ (g)) o hipoxia (1 % O₂ (g)). A-B: Porcentaje de ASC visceral que expresaron CD44, CD140b y CD184 (**A**) y coexpresaron CD140b CD44 ó CD140b CD184 (**B**) según el perfil metabólico de los sujetos. **C:** Correlación del porcentaje de ASC visceral hipóxicas CD140b⁺CD44⁺ y CD140b⁺CD184⁺ con la concentración de triglicéridos y colesterol-total plasmático de los pacientes. (Np = 3; NoSM = 7; SM = 7).

*, Resultados significativamente diferentes (Mann-Whitney; P < 0.05) al de los sujetos Np; †, resultados significativamente diferentes (Mann-Whitney; P < 0.05) al de los sujetos NoSM.

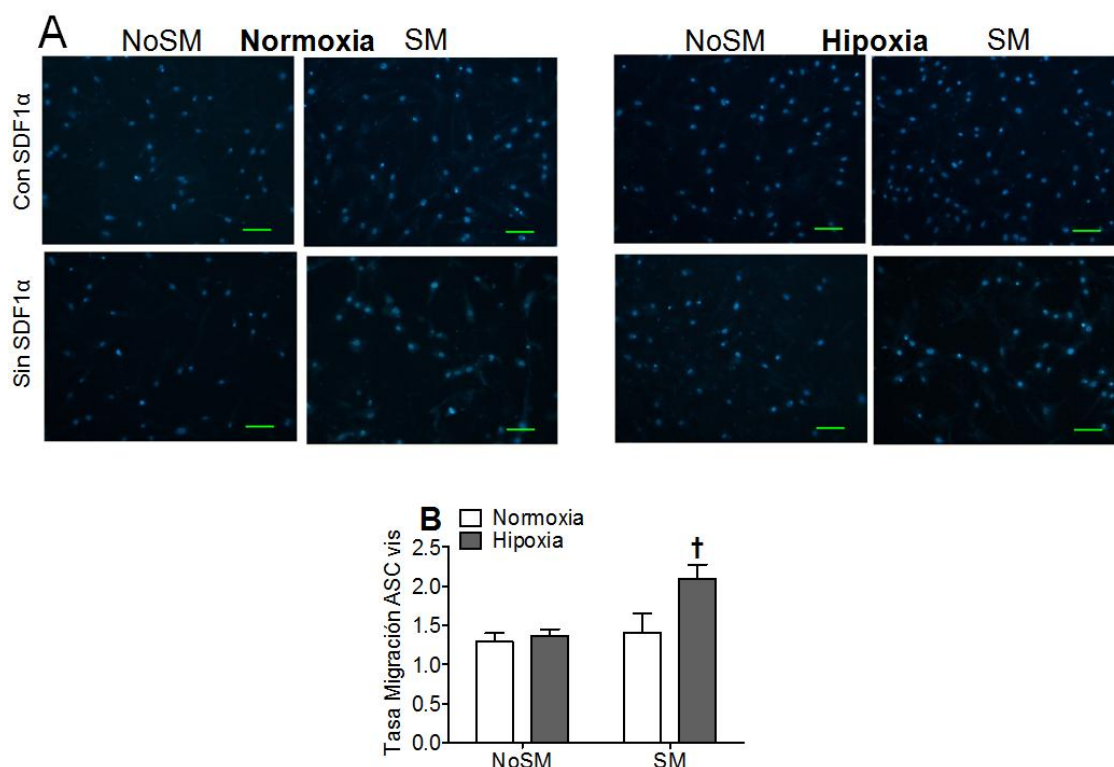


Figura 19. Efectos del SDF1 α sobre la migración de las ASC visceral cultivadas previamente bajo condiciones de normoxia (21 % O₂ (g)) o hipoxia (1 % O₂ (g)). **A:** Recuento de ASC visceral que migraron después de 24 horas de cultivo hacia la superficie inferior de la cámara migratoria, cuyo compartimento contenía medio de cultivo suplementado con 100 ng/mL del SDF1 α o sin SDF1 α . Barra = 100 μ m. **B:** La tasa de migración se calculó dividiendo el número de células detectadas en presencia del SDF1 α respecto a las observadas en ausencia del SDF1 α , los resultados son presentados como valores medios de tasa migración \pm error estándar (NoSM = 4; SM = 4). [†], Resultados significativamente diferentes (Mann-Whitney; $P < 0.05$) al de los sujetos NoSM.

3.3-Alteraciones en los niveles de expresión de miembros de la familia NADPH oxidasa y de citoquinas inflamatorias en las ASC visceral expuestas a condiciones de hipoxia

Considerando que la exposición transitoria de las ASC humanas puede incrementar la generación de ROS por un mecanismo dependiente de NADPH

oxidasa (Kim *et al*, 2011; Kim *et al*, 2012) y que el incremento desproporcionado de ROS podría afectar las funciones de las ASCs (Park *et al*, 2011), seguidamente evaluamos los niveles de expresión de varios miembros de la familia NADP oxidasa debido a su implicación en el desbalance redox que tiene lugar en el tejido adiposo durante la obesidad (Furukawa *et al*, 2004).

Aunque no observamos diferencias relevantes en los niveles de expresión de NOX4 (**Figura 20A**), las ASC visceral hipóxicas de los sujetos SM mostraron un incremento estadísticamente significativo del RNAm NOX5 respecto al de los otros dos grupos de pacientes (**Figura 20B**). Además, las cantidades del RNAm NOX4 y NOX5 incrementaron proporcionalmente a los valores de concentración de triglicéridos, glucosa y al HOMA-IR de los sujetos (**Figura 20C**).

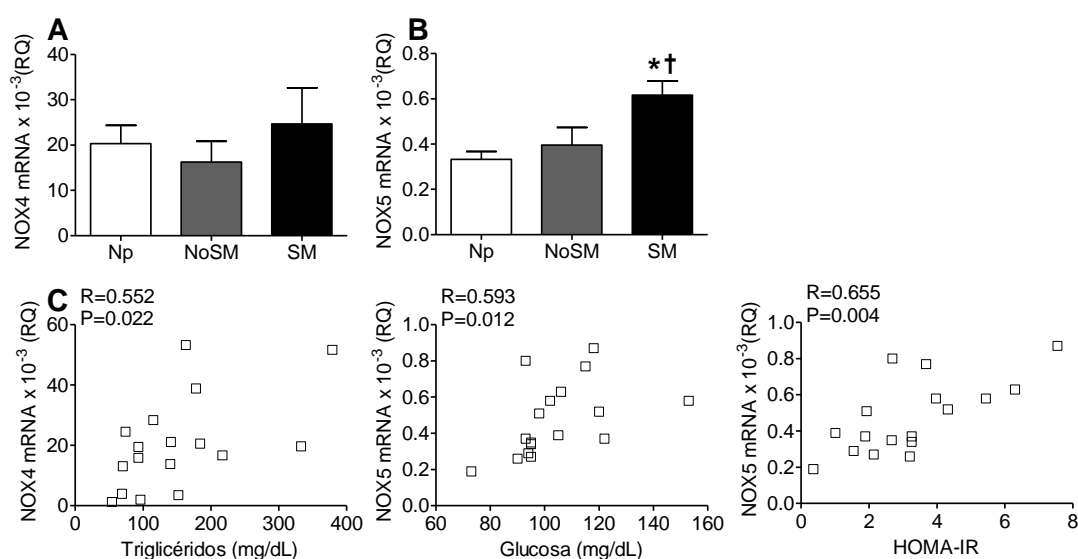


Figura 20. Expresión de NOX4 y NOX5 en las ASC visceral sometidas durante 72 horas a 1 % O₂ (g). **A-B:** Niveles de expresión del RNAm NOX4 (**A**) y NOX5 (**B**) en las ASC visceral hipóxicas de sujetos agrupados según su perfil metabólico. **C:** Correlación entre los niveles transcripcionales del RNAm NOX4 y NOX5 con variables que describen el perfil metabólico de los pacientes. (Np = 3; NoSM = 7; SM = 7). *, Resultados significativamente diferentes (Mann-Whitney; P < 0.05) al de los sujetos Np; †, resultados significativamente diferentes (Mann-Whitney; P < 0.05) al de los sujetos NoSM.

En concordancia a los experimentos que han corroborado que las ROS pueden estimular la vía NF- κ B en las células precursoras adiposas (Minamino *et al*, 2009), las ASC visceral de sujetos SM cultivadas durante 72 horas bajo hipoxia mostraron los mayores niveles de expresión de algunas de las citoquinas vinculadas al SASP (**Figura 21A**). Los niveles de RNAm de la MCP1 en particular se correlacionaron positivamente con el BMI y la circunferencia de la cintura de los sujetos (**Figura 21B**). Aunque no observamos diferencias significativas en los niveles de expresión de las IL1 β e IL8 (**Figura 21A**), los niveles transcripcionales de ambas citoquinas se correlacionaron negativamente de forma significativa con las cantidades del RNAm de la citoquina anti-inflamatoria TGF β 1 (**Figura 21C**).

3.4-Bioactividad del medio condicionado por las ASC visceral cultivadas bajo hipoxia.

La **Figura 22A** muestra que la supervivencia de las HUVECs cultivadas durante 72 horas en el medio condicionado por las ASC visceral hipóxicas se correlacionó negativamente con el HOMA-IR de los pacientes. De hecho, la supervivencia de las cultivadas en el medio condicionado por las ASC visceral de los sujetos SM disminuyó significativamente respecto a la registrada en el medio condicionado por las ASC visceral de los sujetos Np (**Figura 22B**). También observamos que la supervivencia de las HUVECs aumentó proporcionalmente a la concentración del HGF detectada en el medio condicionado por las ASC visceral hipóxicas (**Figura 22C**).

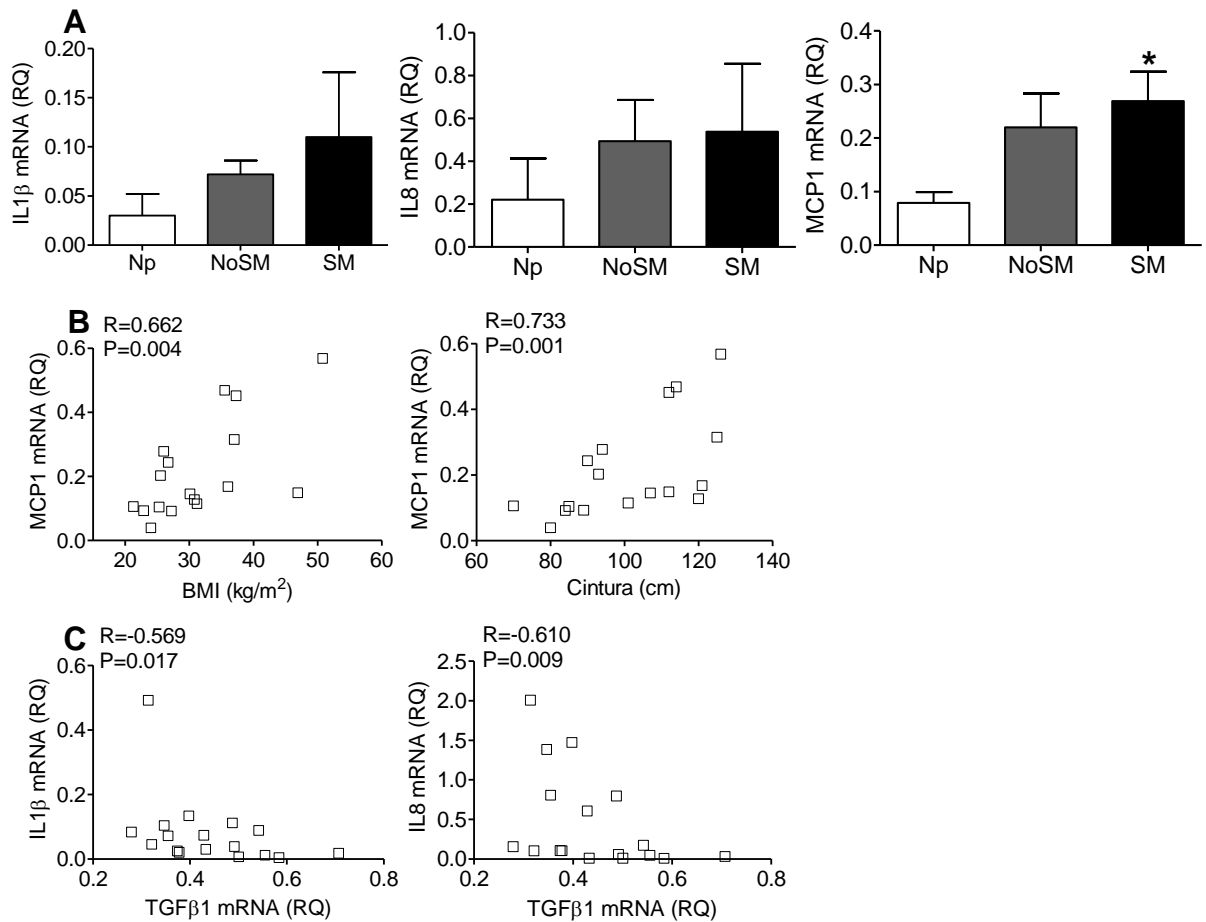


Figura 21. Expresión de citoquinas inflamatorias por las ASC visceral cultivadas durante 72 horas al 1 % O₂ (g). **A:** Niveles de expresión del RNAm IL1β, IL8, MCP1 en las ASC visceral hipóxicas de sujetos agrupados según su perfil metabólico. **B:** Correlación de los niveles de expresión de la MCP1 con el BMI y la circunferencia de la cintura de los pacientes. **C:** Correlación de las cantidades del RNAm IL1β e IL8 con los niveles del TGFβ expresados por las ASC visceral hipóxicas. (Np = 3; NoSM = 7; SM = 7). *, Resultados significativamente diferentes (Mann-Whitney; P < 0.05) al de los sujetos Np.

Aunque no constatamos diferencias significativas en la tasa de incremento de formación de túbulos por las HUVECs cultivadas durante 24 horas en el medio condicionado por las ASC visceral (**Figura 22D**), sus valores se correlacionaron negativamente de forma significativa con el HOMA-IR de los pacientes (**Figura 22E**).

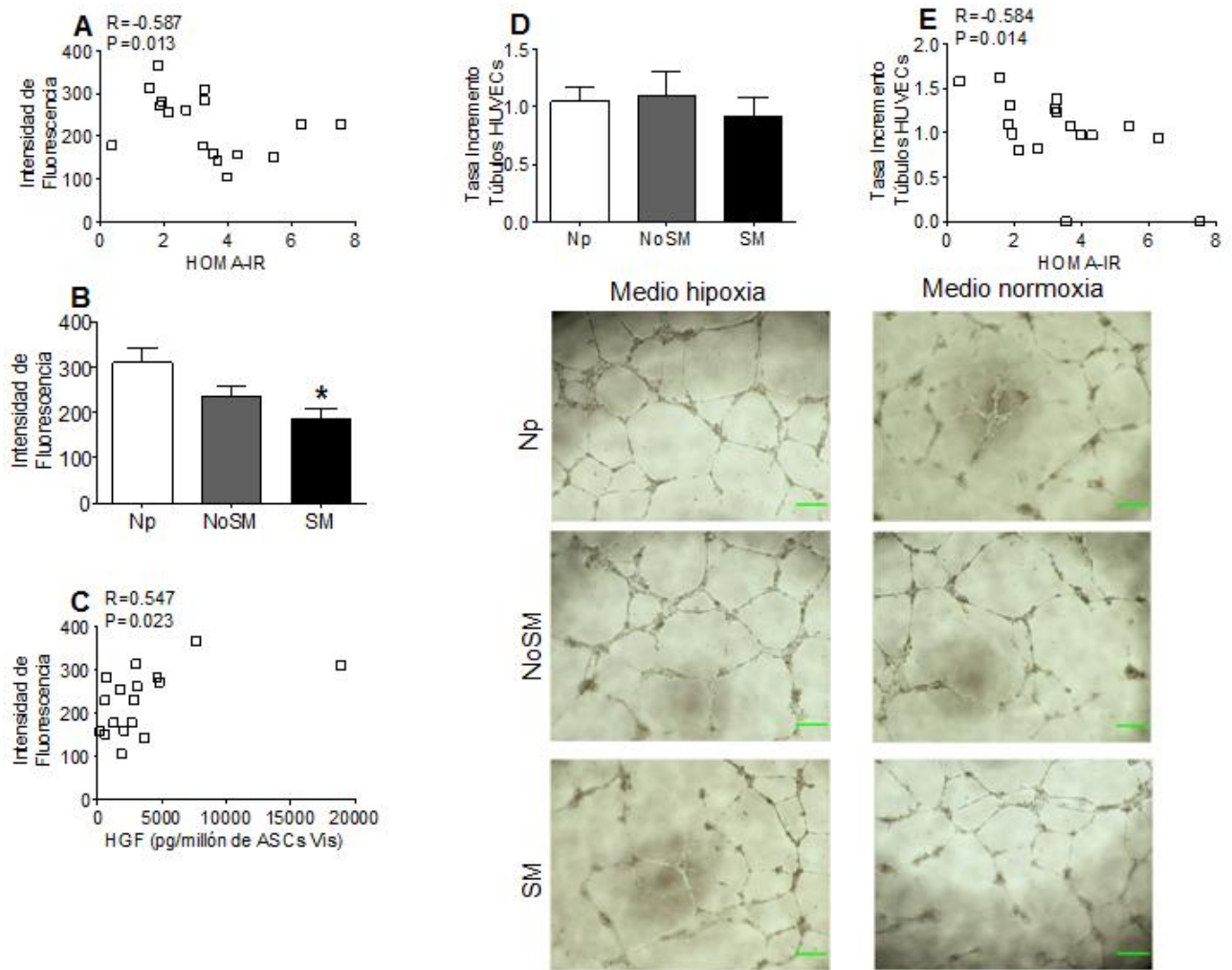


Figura 22. Bioactividad del medio condicionado por las ASC visceral cultivadas durante 72 horas a 1 % O₂ (g). **A-C:** Fluorescencia emitida por las HUVECs que sobrevivieron después de 72 horas de cultivo en medio condicionado por las ASC visceral hipóxicas respecto a las que sobrevivieron en medio no condicionado. **D-E:** Estructuras tubulares y tasa de incremento de la longitud de túbulo generados por las HUVECs cultivadas durante 24 horas en medio condicionado por las ASC visceral hipóxicas respecto a los generados en medio condicionado por las ASC visceral normóxicas. Barra = 250 μ m. (Np = 3; NoSM = 7; SM = 7). *, Resultados significativamente diferentes (Mann-Whitney; $P < 0.05$) al de los sujetos Np.

DISCUSIÓN

1-Las ASC podrían contribuir a la remodelación tisular adiposa observada en sujetos obesos resistentes a la insulina: posible papel protector del FGF2.

En el presente estudio corroboramos que los adipocitos generados a partir de las ASC visceral y subcutáneo evidencian una disminución en los niveles intrínsecos de expresión del transportador de glucosa GLUT4 conforme aumenta la expresión de proteínas fibróticas, el BMI y el HOMA-IR de los pacientes. También observamos que el empeoramiento del perfil metabólico de los sujetos estuvo acompañado por la disminución de la tasa proliferativa, el potencial clonogénico y la exportación del FGF2 hacia la superficie celular de las ASC derivadas de ambos tejidos.

Análisis previos de expresión génica han mostrado que la disminución en los niveles de RNAm GLUT4 del tejido adiposo subcutáneo está más relacionada con la resistencia a la insulina y la diabetes tipo 2 que con la obesidad en sí misma (Kouidhi *et al*, 2013). En línea con éstos resultados, nosotros constatamos que solamente las ASC visceral y subcutáneo de los sujetos SM generaron adipocitos con niveles de expresión GLUT4 inferiores a los de las ASC de sujetos Np.

Es probable que la disminución de los niveles de expresión de GLUT4 en los adipocitos afecte la acumulación citoplasmática de lípidos y la consecuente expansión por hipertrofia del tejido adiposo de sujetos SM, pues recientemente ha sido demostrado que la captación de glucosa mediada por el transportador GLUT4 induce la expresión del factor transcripcional lipogénico ChREBP (Herman *et al*, 2012) y ha sido confirmado que el descenso de los niveles de

GLUT4 que evidencia el tejido adiposo de sujetos obesos resistentes a la insulina en relación a controles no obesos está acompañada por la disminución de enzimas lipogénicas (Eissing *et al*, 2013). Consistente con ésta sugerencia, estudios previos también han corroborado que la disminución del RNAm GLUT4 en el tejido adiposo subcutáneo de sujetos resistentes a la insulina respecto a los sensibles a la insulina está acompañado por el aumento significativo en la tasa de adipocitos pequeños/grandes (McLaughlin *et al*, 2007), que en pacientes diabéticos tipo 2 puede incrementarse hasta un 27 % (Pasarica *et al*, 2009).

Cuando comparamos los dos grupos de obesos, solamente los adipocitos generados a partir de las ASC subcutáneo mostraron diferencias significativas en los niveles de expresión GLUT4, indicando el posible papel protector del tejido adiposo subcutáneo sobre el perfil metabólico de los sujetos NoSM. De hecho, experimentos en modelos transgénicos de ratón han demostrado que el incremento de la capacidad de expansión del tejido adiposo subcutáneo, debido a los efectos de la adiponectina, mejora la sensibilidad a la insulina de los ratones obesos (Kim *et al*, 2007).

También observamos que la disminución de los niveles de expresión GLUT4 no estuvo acompañada por variaciones en las cantidades del RNAm de los factores transcripcionales adipogénicos C/EBP α y PPAR γ sino por el incremento en la expresión de la FN1 y el Col1a1. Por ello no descartamos la posibilidad de que factores transcripcionales asociados a la señalización TGF β e implicados en el incremento de la expresión de FN1 y Col1a1 hayan interferido con la transcripción de GLUT4, pues actualmente es reconocido que la señalización TGF β puede influir sobre la expresión de genes de

diferenciación de células precursoras (Roelen y Dijke, 2003; Massague y Qiaoran, 2012). Además, se ha demostrado que el silenciamiento por siRNA de PPAR γ en preadipocitos humanos durante la fase de inducción adipogénica conduce a la sobre expresión del RNAm Col6a3 (Dankel *et al*, 2014).

De cualquier modo, el incremento significativo de los niveles de expresión de Col1a1 que evidencian las ASC subcutáneo con el aumento del BMI y el HOMA-IR de los pacientes sugiere la contribución de las ASC subcutáneo al aumento de la fibrosis pericelular observada en los adipocitos de sujetos obesos (Divoux *et al*, 2010). Debido a que el incremento de la fibrosis tisular se ha correlacionado negativamente con el tamaño promedio de las fracciones pequeñas y medianas de adipocitos (Khan *et al*, 2009; Pasarica *et al*, 2009; Divoux *et al*, 2010), es probable que los adipocitos generados a partir de las ASC subcutáneo con elevados niveles de expresión de Col1a1 también tengan restringida su capacidad hipertrófica. De hecho, ha sido corroborado que el nivel de expresión del RNAm Colágeno 6a3 en los adipocitos pequeños es significativamente superior al de los adipocitos grandes (Dankel *et al*, 2014).

Interesantemente, las ASC subcutáneo de los sujetos NoSM expresaron valores significativamente elevados de Smad7, proteína inhibitoria de la señalización TGF β , sugiriendo la posibilidad de que estén protegidas del incremento de la fibrosis asociada a la señalización TGF β . Consistente con ésta interpretación, experimentos *in vivo* han demostrado que el bloqueo de la señalización TGF β protege a los ratones de la diabetes y la esteatosis hepática (Yodav *et al*, 2011; Tan *et al*, 2011) mientras que la sobre expresión de Smad7 disminuye la acumulación de proteínas fibróticas en el riñón de ratas diabéticas (Hai *et al*, 2011).

Por otra parte, el aumento en los niveles de expresión Smad7 también podría ser responsable de la mayor susceptibilidad a la apoptosis que muestran las ASCs de sujetos NoSM ya que experimentos *in vitro* han corroborado que Smad7 puede sensibilizar a las células ante la apoptosis inducida por TNF α (Hong *et al*, 2007) probablemente mediante sus efectos inhibitorios sobre la señalización NF-k β (Yan y Chen, 2011).

Aunque las ASCs de los sujetos SM mostraron menor susceptibilidad a la apoptosis inducida por TNF α , su tasa de proliferación disminuyó respecto a la observada en las ASC visceral y subcutáneo de los sujetos Np. El incremento del PDT que evidenciaron las ASC subcutáneo con el aumento del HOMA-IR, la concentración de glucosa y triglicéridos plasmáticos podría disminuir la disponibilidad de células precursoras y por consiguiente contribuir a la disminución del número de adipocitos observada en el tejido adiposo de sujetos obesos resistentes a la insulina (van Harmelen *et al*, 2003; Bakker *et al*, 2006; Pasarica *et al*, 2009). Mientras que la mayor tasa de proliferación observada en las ASC subcutáneo de los sujetos NoSM respecto a los sujetos SM sugiere que su tejido adiposo subcutáneo podría estar en mejores condiciones para expandirse ante las ingestas calóricas, pues experimentos *in vivo* han demostrado que las ASC subcutáneo proliferan en respuesta a una dieta alta en grasa (Joe *et al*, 2009).

Consistente con la disminución del potencial proliferativo de las ASC asociada al empeoramiento del perfil metabólico de los pacientes, el número de colonias generadas por las ASC visceral y subcutáneo de los sujetos SM fue significativamente inferior al observado en los sujetos Np. Al igual que con la expresión de GLUT4 y la tasa de proliferación, sólo las ASC subcutáneo de los

sujetos NoSM evidenciaron mayor potencial clonogénico que la de los sujetos SM durante la comparación de los dos grupos de obesos.

Debido a que el FGF2 es reconocido actualmente como uno de los reguladores intrínsecos de la proliferación y diferenciación de las ASC (Villageais *et al*, 2012), pensamos que podría ser responsable del mantenimiento del potencial proliferativo, clonogénico y niveles de expresión GLUT4 observado fundamentalmente en las ASC subcutáneo de los sujetos NoSM ya que la concentración del FGF2 retenida en la superficie de éstas células fue significativamente superior a la registrada para los otros dos grupos de sujetos. De hecho, se ha demostrado que las ASC expresan un bucle de señalización autocrina FGF2 que favorece el mantenimiento del potencial clonogénico y evita la pérdida de la capacidad de diferenciación (Zaragosi *et al*, 2006; Rider *et al*, 2008).

Por otra parte, experimentos previos también han corroborado que el tratamiento de las ASCs con FGF2 no sólo puede disminuir los niveles de expresión de proteínas fibróticas como fibronectina y colágeno tipo I, sino también revertir el fenotipo miofibroblástico inducido por el TGF β (Desai *et al*, 2014). En línea con éste estudio, nosotros hemos observado que el incremento de la concentración del FGF2 retenido en la superficie de las ASC subcutáneo de los sujetos NoSM está acompañado por la disminución de los niveles de expresión de Col1a1. De éste modo, nuestros resultados sugieren que el FGF2 podría ejercer una función protectora, junto con Smad7, ante la activación de la señalización TGF β a la que son vulnerables las ASC subcutáneo de sujetos obesos según evidencias recientes (Bourlier *et al*, 2012).

2-Deterioro de las propiedades neovasculares de las ASC visceral y subcutáneo de sujetos obesos con resistencia a la insulina.

Es reconocido que la expansión del tejido adiposo no sólo depende de la hiperplasia e hipertrofia de sus células adiposas, sino también del crecimiento de su red vascular. De hecho, cada vez más evidencias corroboran que la angiogénesis deficiente es uno de los fenómenos implicados en la disfunción del tejido adiposo que caracteriza a los sujetos obesos con resistencia a la insulina (Corvera y Galekman, 2014). De éste modo el incremento de la fibrosis tisular adiposa además de estar asociado a la disminución del tamaño promedio de los adipocitos pequeños y medianos (Khan *et al*, 2009; Pasarica *et al*, 2009a; Divoux *et al*, 2010), también se ha vinculado con el descenso de las presiones parciales de oxígeno y de la densidad capilar del tejido adiposo de sujetos obesos (Pasarica *et al*, 2009b; Spencer *et al*, 2011). Debido a la residencia perivascular de las ASC (Tang *et al*, 2008), su potencial para diferenciarse hacia células endoteliales (Planat-Benard *et al*, 2004; Wosnitza *et al*, 2007) y su participación, ampliamente reconocida, en la formación de nuevos vasos sanguíneos es razonable asumir que posiblemente desempeñen un papel relevante en la coordinación del crecimiento tisular y la expansión de la red vascular adiposa. Por ello pensamos que el estado de sus propiedades neovasculares podría influir sobre el potencial angiogénico de los depósitos adiposos y en consecuencia sobre la capacidad de expansión del tejido adiposo.

Durante la segunda parte del estudio corroboramos que la capacidad de formación de túbulos de las ASC visceral y subcutáneo de los sujetos SM fue significativamente inferior que la de los sujetos NoSM. Sin embargo, al igual

que los resultados obtenidos por Oñate *et al* (2012), la longitud media de los túbulos generados por las ASCs de los sujetos SM no difirió significativamente respecto a los formados por las ASCs de sujetos Np.

La variación en la capacidad de formación de túbulos por las ASC estuvo acompañada por el incremento en los niveles de expresión del RNAm NOX5 y NOX4 en las ASC visceral y subcutáneo de los sujetos obesos, que en el caso particular del RNAm NOX4 expresado por las ASC subcutáneo de sujetos SM fue significativamente superior al de las ASC subcutáneo de los sujetos Np. Además, los niveles de expresión del RNAm NOX5 y NOX4 en las ASC visceral y subcutáneo, respectivamente, incrementaron significativamente con el empeoramiento del perfil lipídico de los sujetos.

Aunque múltiples estudios han corroborado que las ROS derivadas de la actividad NADPH oxidasa contribuyen a la señalización redox involucrada en la supervivencia, proliferación, migración y diferenciación de varios tipos de células precursoras (Ushio-Fukai y Urao, 2009), cada vez más evidencias corroboran que las alteraciones en el balance redox celular pueden afectar las funciones de las células precursoras (Case *et al*, 2008; Atashi *et al*, 2015). Debido a que los mismos factores involucrados en la resistencia a la insulina del tejido adiposo, como la hipoxia y la inflamación, también favorecen el desbalance en la producción de ROS mediante la sobre expresión de NADPH oxidasa (Bashan *et al*, 2009), es probable que los niveles de expresión de NOX4 y NOX5 observados en las ASCs de sujetos NoSM incrementen la generación de ROS a unos niveles lo suficientemente elevados como para estimular la formación de túbulos respecto a las ASCs de sujetos Np pero no tan elevados como para inhibirlos como sucede en las ASCs de los sujetos SM.

También pensamos que las diferencias en el estado inflamatorio que caracteriza al tejido adiposo de sujetos obesos con distintos grados de resistencia a la insulina (Barbarroja *et al*, 2010; Klöting *et al*, 2010; Hardy *et al*, 2011; Klimcakova *et al*, 2011) podrían estar contribuyendo al incremento significativo de los niveles de expresión del RNAm NOX4 y NOX5 que hemos observado con el empeoramiento del perfil lipídico de los pacientes, pues se ha reportado la existencia de elementos de unión para factores transcripcionales proinflamatorios en regiones promotoras de NOX4 (Manea *et al*, 2010) y NOX5 (Manea *et al*, 2012).

Los experimentos donde se ha corroborado que la inhibición de la diferenciación adipogénica puede abortar la formación de nuevos vasos sanguíneos (Fukumura *et al*, 2003) y que el bloqueo de la angiogénesis interrumpe la generación de nuevos adipocitos (Fukumura *et al*, 2003; Nishimura *et al*, 2007) han puesto de manifiesto la posibilidad de que la función adipogénica de las ASC esté estrechamente vinculada a la expansión vascular del tejido adiposo. Pensamos que la secreción de citoquinas neovasculares durante la adipogénesis podría ser uno de los mecanismos por el que las ASC acoplan su función adipogénica con la neovascular, pues experimentos *in vitro* han corroborado que las ASC humanas incrementan significativamente la secreción del VEGF durante su diferenciación adipogénica (Verseijden *et al*, 2009).

Considerando que la diferenciación adipogénica de los preadipocitos involucra la producción de ROS (Furukawa *et al*, 2004; Lee *et al*, 2009; Higuchi *et al*, 2013), es lógico admitir que el incremento en los niveles de expresión del RNAm NOX4 y NOX5 observado en las ASCs de sujetos SM pudiera generar

un desbalance en la producción de ROS con consecuencias para la función neovascular adipogénica de las ASCs. En efecto, observamos que conforme aumentaba el BMI y la concentración de colesterol-LDL plasmático de los sujetos disminuía la concentración del VEGF secretada por las ASC de ambos tejidos, y de modo significativo en las ASC subcutáneo. Debido a la relevancia del VEGF como citoquina angiogénica, la disminución significativa de los niveles de secreción del VEGF por las ASC subcutáneo de los sujetos SM, y no por las ASC visceral, sugiere la mayor implicación del tejido adiposo subcutáneo en la disminución de la expansión angiogénica asociada al síndrome metabólico. Acorde con ésta observación, experimentos *ex vivo*, donde se comparó el potencial angiogénico de explantes de tejido adiposo visceral y subcutáneo, corroboraron que solamente los explantes de tejido adiposo subcutáneo evidenciaron una disminución de su potencial angiogénico con el incremento del BMI y el HOMA-IR de los sujetos (Gealekman *et al*, 2011).

Por otra parte, los niveles de secreción del HGF revelaron un patrón opuesto al del VEGF ya que ascendieron significativamente en las ASC visceral y subcutáneo con el incremento del BMI y la concentración de triglicéridos plasmáticos, respectivamente. Estos resultados sugieren la posible contribución de las ASC visceral y subcutáneo al incremento de los niveles circulantes del HGF observado con el aumento del BMI (Rehman *et al*, 2003; Bell *et al*, 2006) y los triglicéridos plasmáticos (de Courten *et al*, 2013) así como la posible implicación de la actividad secretora de las ASCs en el riesgo de desarrollo de resistencia a la insulina (Tsukagawa *et al*, 2013) y complicaciones ateroscleróticas (Satani *et al*, 2006) asociadas al aumento de la concentración

del HGF sérico. También observamos una correlación negativa estadísticamente relevante entre los niveles de secreción del HGF y el VEGF en las ASC visceral, y no en las ASC subcutáneo, que denota la contribución diferencial del HGF respecto al VEGF a la expansión vascular del tejido adiposo visceral y al consecuente riesgo de síndrome metabólico asociado a la obesidad visceral (Després y Lemieux, 2006).

Mientras la disminución de los niveles de secreción del VEGF por las ASC visceral estuvo asociada al incremento de la secreción del HGF, la disminución detectada en las ASC subcutáneo fue acompañada por alteraciones en los niveles de expresión de citoquinas inflamatorias que se correlacionaron positivamente con la concentración de glucosa plasmática. Un patrón similar fue revelado en explantes de tejido adiposo subcutáneo, donde los niveles de expresión del RNAm VEGF se correlacionaron negativamente con la secreción de IL1 α y los niveles de secreción de citoquinas proinflamatorias incrementaron proporcionalmente con el porcentaje de grasa de los sujetos (Pasarica *et al*, 2009b).

La IL1 β , IL8 y la MCP1 son consideradas actualmente como citoquinas que forman parte del SASP, cuya expresión está estrechamente vinculada a la senescencia celular que tiene lugar bajo ambientes de estrés e inflamación crónica y es estimulada fundamentalmente por la activación de la señalización NF-k β (Salminen *et al*, 2012; Tchkonja *et al*, 2013). Teniendo en cuenta la influencia que ejercen las ROS sobre la activación del NF-k β (Morgan y Liu, 2011), es probable que la generación de ROS asociada a los niveles elevados de expresión de NOX4 en las ASC subcutáneo esté contribuyendo al incremento de la expresión de éstas citoquinas inflamatorias. En línea con

nuestra interpretación, experimentos *in vitro* han corroborado que el tratamiento de preadipocitos con H₂O₂ causa la inducción de citoquinas inflamatorias por un mecanismo dependientes del NF- κ B (Minamino *et al*, 2009). De éste modo, es probable que las ASC subcutáneo estén implicadas en el incremento de los niveles de expresión del RNAm IL8 y MCP1 reportado previamente para el tejido adiposo subcutáneo de individuos obesos resistentes a la insulina respecto a los sensibles a la insulina (McLauglin *et al*, 2006).

Debido probablemente a la disminución de la concentración del VEGF secretado por las ASC subcutáneo de los sujetos SM durante la diferenciación adipogénica, la tasa de incremento en la formación de túbulos por las HUVECs cultivadas en el medio condicionado por las ASC subcutáneo de sujetos SM disminuyó significativamente respecto a la de los sujetos NoSM. Considerando la contribución de los preadipocitos y las ASCs al ensamblaje y estabilización *in vivo* de la red vascular (Fukumura *et al*, 2003; Amos *et al*, 2008; Traktuev *et al*, 2009), los efectos del medio condicionado sobre la formación de túbulos por HUVECs observados en nuestros experimentos sugieren la posible implicación de las ASC subcutáneo de los sujetos SM en la disminución de la densidad capilar observada en el tejido adiposo subcutáneo de sujetos obesos resistentes a la insulina (Gealekman *et al*, 2011; Spencer *et al*, 2011).

3-Las ASC visceral de sujetos SM evidencian una respuesta neovascular deficiente bajo condiciones de hipoxia.

El marcaje *in vivo* con bromodesoxiuridina de ratones expuestos a una dieta alta en grasa ha confirmado que mientras el tejido adiposo subcutáneo se expande por hiperplasia, el visceral lo hace por hipertrofia (Joe *et al*, 2009). Se piensa que durante la expansión por hipertrofia los adipocitos pueden alcanzar tamaños que superan la distancia de difusión del O_2 (g) y en consecuencia se generan regiones de hipoxia (Trayhurn, 2013). De hecho, la hipoxia es considerada como uno de los fenómenos desencadenantes no sólo de la expansión angiogénica sino también de la respuesta fibrótica e inflamatoria que alternativamente tiene lugar en el tejido adiposo según el estado metabólico del organismo (Trayhurn, 2013; Cao, 2013; Corvera y Gealekman, 2014). Es probable que las ASC tengan una participación activa en la expansión angiogénica de las regiones del tejido adiposo sometidas a hipoxia, pues se ha corroborado que ante la disminución de las presiones parciales de O_2 (g) pueden incrementar su proliferación, migración, secreción de citoquinas angiogénicas (Rehman *et al*, 2004; Thangarah *et al*, 2009; Lee *et al*, 2009; Park *et al*, 2010; Rasmussen *et al*, 2011) e implicarse en la formación de nuevos vasos sanguíneos según experimentos *in vivo* efectuados en modelos de extremidades isquémicas (Rehman *et al*, 2004; Miranville *et al*, 2004; Cao *et al*, 2005; Moon *et al*, 2006). De éste modo, parece lógico suponer que variaciones en la capacidad de respuesta neovascular de las ASCs ante condiciones de hipoxia también podrían tener repercusiones sobre el potencial angiogénico de los depósitos adiposos en expansión.

En la última parte del presente estudio constatamos un incremento de la capacidad de formación de túbulos bajo condiciones de hipoxia de las ASC visceral de los sujetos NoSM respecto a la de los sujetos Np y SM, que estuvo acompañada por diferencias estadísticamente significativas entre las ASC visceral hipóxicas de los dos grupos de sujetos obesos en relación al porcentaje de células CD140b⁺, la tasa migratoria y los niveles de expresión RNAm NOX5.

Experimentos previos han corroborado que la exposición de las ASC humanas a 10 minutos de hipoxia incrementa la generación de ROS por mediación de la actividad NADPH oxidasa y favorece la activación del receptor CD140b (Kim *et al*, 2011; Kim *et al*, 2012). Más recientemente se ha reportado que la activación dependiente de ligando PDGF-D de la señalización asociada al receptor CD140b también favorece la generación de ROS mitocondrial (Kim *et al*, 2015). De acuerdo a estos estudios, la activación del receptor CD140b podría influir en el balance redox celular de las ASC humanas ya que por una parte es diana de las ROS generadas por la actividad NADPH oxidasa inducida por hipoxia y, por otra parte, su activación dependiente de ligando PDGF-D favorece la generación de ROS mitocondrial. Considerando los efectos nocivos del desbalance redox para las células precursoras (Case *et al*, 2008; Atashi *et al*, 2015), parece posible que el incremento significativo del porcentaje de células CD140b⁺ y del RNAm NOX5 observado en las ASC visceral hipóxicas de sujetos SM haya contribuido a las diferencias en la capacidad de formación de túbulos entre las ASC visceral de los dos grupos de obesos así como al descenso significativo de los niveles de secreción del VEGF detectado con el incremento de la concentración de glucosa plasmática de los pacientes.

En línea con una posible activación de la señalización NF- κ B por desbalance redox (Minamino *et al*, 2009; Morgan y Liu, 2011), nuestro laboratorio ha revelado previamente un incremento del porcentaje de ASC visceral senescente asociadas al marcaje β -galactosidasa en pacientes con obesidad mórbida (Mar *et al*, 2011) y en el presente estudio también corroboramos alteraciones en los niveles de expresión de citoquinas vinculadas al SASP. De hecho, los niveles de expresión de la MCP1 incrementaron significativamente con el aumento del BMI y la circunferencia de la cintura de los pacientes. Debido a que experimentos en ratones manipulados genéticamente han demostrado que el incremento en los niveles de la MCP1 favorece la infiltración de macrófagos hacia el tejido adiposo y la aparición del fenotipo resistente a la insulina (Kanda *et al*, 2006; Kamei *et al*, 2006), es probable que las ASC visceral contribuyan al empeoramiento del estado inflamatorio que evidencia el tejido adiposo visceral de los sujetos obesos resistentes a la insulina respecto a los sensibles a la insulina (Barbarroja *et al*, 2010; Klöting *et al*, 2010; Hardy *et al*, 2011; Klimcakova *et al*, 2011). Concordantemente, las ASC visceral hipóxicas de sujetos SM mostraron niveles RNAm MCP1 significativamente mayor que los expresados por las de los sujetos Np. En éste sentido es interesante observar que el incremento de los niveles de expresión de IL1 β e IL8 se correlacionó inversamente con los del TGF β 1, citoquina involucrada en el control de la respuesta inmune (Travis y Sheppard, 2014).

Consistente con la posibilidad de que las ASCs contribuyan activamente al incremento de la inflamación tisular, experimentos *in vitro* han revelado que los preadipocitos humanos expuestos a hipoxia secretan concentraciones más elevadas de citoquinas inflamatorias que los adipocitos y su medio

condicionado provoca un incremento mayor en la expresión de ICAM-1 así como una mayor adhesión de monocitos a las células endoteliales (Mack *et al*, 2009). Interesantemente, nosotros observamos una tendencia a que el porcentaje de ASC visceral hipóxicas CD140b⁺CD44⁺ incrementara con el empeoramiento del perfil lipídico de los sujetos, lo cual sugiere la implicación de las ASC en el reclutamiento de monocitos ya que se ha reportado que CD44 participa en el secuestro de monocitos hacia los tejidos inflamados (Meran *et al*, 2013). Además, las ASC visceral hipóxicas de los sujetos SM mostraron mayor capacidad de migración ante los efectos quimiotácticos del SDF1 α , confirmando que éstas células también podrían movilizarse ante el SDF1 α secretado por las células endoteliales (Sengenés *et al*, 2007).

Aunque los efectos quimiotácticos del SDF1 α han sido vinculados al incremento del potencial angiogénico de las ASC humanas sometidas a hipoxia (Thangarajah *et al*, 2009), nuestros resultados indican lo contrario para el caso particular de las ASC visceral de sujetos obesos ya que, por una parte, observamos un incremento significativo del porcentaje de ASC visceral hipóxicas CD140b⁺CD184⁺ con el empeoramiento del perfil lipídico de los pacientes y, por otra parte, la supervivencia de las HUVECs cultivadas en el medio condicionado por las ASC visceral hipóxicas de sujetos SM disminuyó significativamente respecto a las cultivadas en el medio condicionado por las ASC visceral hipóxicas de sujetos Np. Además, la supervivencia y la tasa de formación de túbulos por las HUVECs disminuyeron significativamente con el incremento del HOMA-IR de los pacientes.

Debido a que observamos una correlación positiva estadísticamente significativa entre la supervivencia de las HUVECs y la concentración del HGF

detectada en el medio condicionado por las ASC, parece probable que el HGF haya influido sobre la supervivencia celular. En efecto, la aplicación de técnicas de RNA interferencia ha demostrado que la supresión del HGF en las ASCs conduce a la disminución de la supervivencia y proliferación de las células del linaje endotelial cultivadas en su medio condicionado (Cai *et al*, 2007).

CONCLUSIONES

1-Las ASC visceral y subcutáneo podrían estar implicadas en las variaciones de la celularidad adiposa que acontece durante el desarrollo de la resistencia a la insulina mediante la disminución de su potencial clonogénico, proliferativo y la generación de adipocitos con niveles inferiores de expresión de GLUT4 y elevada expresión de proteínas fibróticas.

2-Las ASC parecen contribuir a los efectos protectores de la expansión del tejido adiposo subcutáneo en los sujetos obesos NoSM mediante la estimulación de la señalización autocrina asociada a la retención superficial del FGF2.

3-El deterioro de las propiedades neovasculares observado en las ASCs de los sujetos SM podría contribuir a que su tejido adiposo no alcance la vascularización apropiada para su expansión adiposa.

4-Las ASC de los sujetos NoSM podrían favorecer el mantenimiento de la capacidad angiogénica y la expansión del tejido adiposo mediante la preservación de sus propiedades neovasculares.

5-Las ASC visceral de sujetos SM sometidas a hipoxia muestran una predisposición inflamatoria, en detrimento de su función neovascular, que podría contribuir a la disminución del potencial angiogénico y al incremento de la inflamación que subyace a la disfunción del tejido adiposo en la obesidad.

6-Aunque podrían existir diferencias innatas en la capacidad de expansión del tejido adiposo, nuestros resultados también sugieren que el funcionamiento del tejido adiposo parece condicionar el propio deterioro de sus células precursoras y ante el cual las ASCs de los sujetos que desarrollan síndrome metabólico son más vulnerables.

7-El deterioro funcional de las ASCs de los sujetos con síndrome metabólico podría comprometer su uso en la terapia celular autóloga.

BIBLIOGRAFÍA

Abbas A; Lichtman A; and Pillai Sh. Inmunología celular y molecular. 2009. Sexta edición. Elsevier.

Amos PJ, Shang H, Bailey AM, Taylor A, Katz AJ, Peirce SM. IFATS collection: The role of human adipose-derived stromal cells in inflammatory microvascular remodeling and evidence of a perivascular phenotype. *Stem Cells*. 2008 Oct;26(10):2682-90.

Anderson P, Souza-Moreira L, Morell M, Caro M, O'Valle F, Gonzalez-Rey E, Delgado M. Adipose-derived mesenchymal stromal cells induce immunomodulatory macrophages which protect from experimental colitis and sepsis. *Gut*. 2013 Aug;62(8):1131-41.

Arner E, Westermark PO, Spalding KL, Britton T, Rydén M, Frisén J, Bernard S, Arner P. Adipocyte turnover: relevance to human adipose tissue morphology. *Diabetes*. 2010 Jan;59(1):105-9.

Aron-Wisnewsky J, Tordjman J, Poitou C, Darakhshan F, Hugol D, Basdevant A, Aissat A, Guerre-Millo M, Clément K. Human adipose tissue macrophages: m1 and m2 cell surface markers in subcutaneous and omental depots and after weight loss. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 Nov;94(11):4619-23.

Astori G, Vignati F, Bardelli S, Tubio M, Gola M, Albertini V, Bambi F, Scali G, Castelli D, Rasini V, Soldati G, Moccetti T. "In vitro" and multicolor phenotypic characterization of cell subpopulations identified in fresh human adipose tissue stromal vascular fraction and in the derived mesenchymal stem cells. *J Transl Med*. 2007 Oct 31;5:55.

Atashi F, Modarressi A, Pepper MS. The role of reactive oxygen species in mesenchymal stem cell adipogenic and osteogenic differentiation: a review. *Stem Cells Dev*. 2015 May 15;24(10):1150-63.

Baglioni S, Francalanci M, Squecco R, Lombardi A, Cantini G, Angeli R, Gelmini S, Guasti D, Benvenuti S, Annunziato F, Bani D, Liotta F, Francini F, Perigli G, Serio M, Luconi M. Characterization of human adult stem-cell populations isolated from visceral and subcutaneous adipose tissue. *FASEB J*. 2009 Oct;23(10):3494-505.

Bahceci M, Gokalp D, Bahceci S, Tuzcu A, Atmaca S, Arikan S. The correlation between adiposity and adiponectin, tumor necrosis factor alpha, interleukin-6 and high sensitivity C-reactive protein levels. Is adipocyte size associated with inflammation in adults? J Endocrinol Invest. 2007 Mar;30(3):210-4.

Bakker AH, Nijhuis J, Buurman WA, van Dielen FM, Greve JW. Low number of omental preadipocytes with high leptin and low adiponectin secretion is associated with high fasting plasma glucose levels in obese subjects. Diabetes Obes Metab. 2006 Sep;8(5):585-8.

Balwierz A, Czech U, Polus A, Filipkowski RK, Mioduszevska B, Proszynski T, Kolodziejczyk P, Skrzeczynska-Moncznik J, Dudek W, Kaczmarek L, Kulig J, Pryjma J, Dembinska-Kiec A. Human adipose tissue stromal vascular fraction cells differentiate depending on distinct types of media. Cell Prolif. 2008 Jun;41(3):441-59.

Barbarroja N, López-Pedrerera R, Mayas MD, García-Fuentes E, Garrido-Sánchez L, Macías-González M, El Bekay R, Vidal-Puig A, Tinahones FJ. The obese healthy paradox: is inflammation the answer? Biochem J. 2010 Aug 15;430(1):141-9.

Bashan N, Kovsan J, Kachko I, Ovadia H, Rudich A. Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species. Physiol Rev. 2009 Jan;89(1):27-71.

Baynes J W. Oxígeno y vida. 2011. En Bioquímica Médica. Editado por Baynes J W and Dominiczak MH. Editorial Elsevier.

Bell LN, Cai L, Johnstone BH, Traktuev DO, March KL, Considine RV. A central role for hepatocyte growth factor in adipose tissue angiogenesis. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2008 Feb; 294(2):E336-44.

Berry R, Rodeheffer MS. Characterization of the adipocyte cellular lineage *in vivo*. Nat Cell Biol. 2013 Mar;15(3):302-8.

Bessesen DH. Update on obesity. J Clin Endocrinol Metab. 2008 Jun;93(6):2027-34.

Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*. 2008 Apr 10;2(4):313-9.

Bieback K, Wuchter P, Besser D, Franke W, Becker M, Ott M, Pacher M, Ma N, Stamm C, Klüter H, Müller A, Ho AD; START-MSC consortium. Mesenchymal stromal cells (MSCs): science and f(r)iction. *J Mol Med (Berl)*. 2012 Jul;90(7):773-82.

Biscetti F, Gaetani E, Flex A, Aprahamian T, Hopkins T, Straface G, Pecorini G, Stigliano E, Smith RC, Angelini F, Castellot JJ Jr, Pola R. Selective activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)alpha and PPAR gamma induces neoangiogenesis through a vascular endothelial growth factor-dependent mechanism. *Diabetes*. 2008 May; 57(5):1394-404.

Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell*. 2001 Jun 29;105(7):829-41.

Blüher M. Adipose tissue dysfunction in obesity. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2009 Jun;117(6):241-50.

Boquest AC, Noer A, Sørensen AL, Vekterud K, Collas P. CpG methylation profiles of endothelial cell-specific gene promoter regions in adipose tissue stem cells suggest limited differentiation potential toward the endothelial cell lineage. *Stem Cells*. 2007 Apr;25(4):852-61.

Boquest AC, Shahdadfar A, Frønsdal K, Sigurjonsson O, Tunheim SH, Collas P, Brinchmann JE. Isolation and transcription profiling of purified uncultured human stromal stem cells: alteration of gene expression after in vitro cell culture. *Mol Biol Cell*. 2005 Mar;16(3):1131-41.

Borges J, Müller MC, Momeni A, Stark GB, Torio-Padron N. *In vitro* analysis of the interactions between preadipocytes and endothelial cells in a 3D fibrin matrix. *Minim Invasive Ther Allied Technol*. 2007; 16(3):141-8.

Borges J, Torío-Padrón N, Momeni A, Mueller MC, Tegtmeier FT, Stark BG. Adipose precursor cells (preadipocytes) induce formation of new vessels in fibrin glue on the newly developed cylinder chorioallantoic membrane model (CAM). *Minim Invasive Ther Allied Technol*. 2006; 15(4):246-52.

Bouloumié A, Lolmède K, Sengenès C, Galitzky J, Lafontan M. Angiogenesis in adipose tissue. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2002 Apr;63(2 Pt 1):91-5.

Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, Redl H, Rubin JP, Yoshimura K, Gimble JM. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy*. 2013 Jun;15(6):641-8.

Bourlier V, Sengenès C, Zakaroff-Girard A, Decaunes P, Wdziekonski B, Galitzky J, Villageois P, Esteve D, Chiotasso P, Dani C, Bouloumié A. TGFbeta family members are key mediators in the induction of myofibroblast phenotype of human adipose tissue progenitor cells by macrophages. *PLoS One*. 2012;7(2):e31274.

Bourlier V, Zakaroff-Girard A, Miranville A, De Barros S, Maumus M, Sengenès C, Galitzky J, Lafontan M, Karpe F, Frayn KN, Bouloumié A. Remodeling phenotype of human subcutaneous adipose tissue macrophages. *Circulation*. 2008 Feb 12;117(6):806-15.

Bunnell BA, Flaatt M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*. 2008 Jun;45(2):115-20.

Burrill DR, Silver PA. Making cellular memories. *Cell*. 2010 Jan 8;140(1):13-8.

Cai L, Johnstone BH, Cook TG, Liang Z, Traktuev D, Cornetta K, Ingram DA, Rosen ED, March KL. Suppression of hepatocyte growth factor production impairs the ability of adipose-derived stem cells to promote ischemic tissue revascularization. *Stem Cells*. 2007 Dec;25(12):3234-43.

Cancello R, Henegar C, Viguerie N, Taleb S, Poitou C, Rouault C, Coupaye M, Pelloux V, Hugol D, Bouillot JL, Bouloumié A, Barbatelli G, Cinti S, Svensson PA, Barsh GS, Zucker JD, Basdevant A, Langin D, Clément K. Reduction of macrophage infiltration and chemoattractant gene expression changes in white adipose tissue of morbidly obese subjects after surgery-induced weight loss. *Diabetes*. 2005 Aug;54(8):2277-86.

Cancello R, Zulian A, Gentilini D, Mencarelli M, Della Barba A, Maffei M, Vitti P, Invitti C, Liuzzi A, Di Blasio AM. Permanence of molecular features of obesity in subcutaneous adipose tissue of ex-obese subjects. *Int J Obes (Lond)*. 2013 Jun;37(6):867-73.

Cao Y, Sun Z, Liao L, Meng Y, Han Q, Zhao RC. Human adipose tissue-derived stem cells differentiate into endothelial cells *in vitro* and improve postnatal neovascularization *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Jul 1;332(2):370-9.

Cao Y. Angiogenesis and vascular functions in modulation of obesity, adipose metabolism, and insulin sensitivity. *Cell Metab*. 2013 Oct 1;18(4):478-89.

Cao Y. Angiogenesis modulates adipogenesis and obesity. *J Clin Invest*. 2007 Sep;117(9):2362-8.

Carrière A, Carmona MC, Fernandez Y, Rigoulet M, Wenger RH, Pénicaud L, Casteilla L. Mitochondrial reactive oxygen species control the transcription factor CHOP-10/GADD153 and adipocyte differentiation: a mechanism for hypoxia-dependent effect. *J Biol Chem*. 2004 Sep 24;279(39):40462-9.

Carrière A, Carmona MC, Fernandez Y, Rigoulet M, Wenger RH, Pénicaud L, Casteilla L. Mitochondrial reactive oxygen species control the transcription factor CHOP-10/GADD153 and adipocyte differentiation: a mechanism for hypoxia-dependent effect. *J Biol Chem*. 2004 Sep 24;279(39):40462-9.

Carrière A, Ebrahimian TG, Dehez S, Augé N, Joffre C, André M, Arnal S, Duriez M, Barreau C, Arnaud E, Fernandez Y, Planat-Benard V, Lévy B, Pénicaud L, Silvestre JS, Casteilla L. Preconditioning by mitochondrial reactive oxygen species improves the proangiogenic potential of adipose-derived cells-based therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 Jul;29(7):1093-9.

Case J, Ingram DA, Haneline LS. Oxidative stress impairs endothelial progenitor cell function. *Antioxid Redox Signal*. 2008 Nov;10(11):1895-907.

Caserta F, Tchkonja T, Civelek VN, Prentki M, Brown NF, McGarry JD, Forse RA, Corkey BE, Hamilton JA, Kirkland JL. Fat depot origin affects fatty acid

handling in cultured rat and human preadipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001 Feb;280(2):E238-47.

Castellot JJ Jr, Karnovsky MJ, Spiegelman BM. Differentiation-dependent stimulation of neovascularization and endothelial cell chemotaxis by 3T3 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982 Sep; 79(18):5597-601.

Cawthorn WP, Scheller EL, MacDougald OA. Adipose tissue stem cells meet preadipocyte commitment: going back to the future. *J Lipid Res.* 2012 Feb;53(2):227-46.

Charrière G, Cousin B, Arnaud E, André M, Bacou F, Penicaud L, Casteilla L. Preadipocyte conversion to macrophage. Evidence of plasticity. *J Biol Chem.* 2003 Mar 14;278(11):9850-5.

Chawla A, Nguyen KD, Goh YP. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. *Nat Rev Immunol.* 2011 Oct 10;11(11):738-49.

Chen HY, Huang XR, Wang W, Li JH, Heuchel RL, Chung AC, Lan HY. The protective role of Smad7 in diabetic kidney disease: mechanism and therapeutic potential. *Diabetes.* 2011 Feb;60(2):590-601.

Chen L, Tredget EE, Wu PY, Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One.* 2008 Apr 2;3(4):e1886.

Cho CH, Koh YJ, Han J, Sung HK, Jong Lee H, Morisada T, Schwendener RA, Brekken RA, Kang G, Oike Y, Choi TS, Suda T, Yoo OJ, Koh GY. Angiogenic role of LYVE-1-positive macrophages in adipose tissue. *Circ Res.* 2007 Mar 2; 100(4):e47-57.

Christiaens V, Lijnen HR. Angiogenesis and development of adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol.* 2010 Apr 29;318(1-2):2-9.

Chun TH, Hotary KB, Sabeh F, Saltiel AR, Allen ED, Weiss SJ. A pericellular collagenase directs the 3-dimensional development of white adipose tissue. *Cell.* 2006 May 5;125(3):577-91.

Clément K, Viguerie N, Poitou C, Carette C, Pelloux V, Curat CA, Sicard A, Rome S, Benis A, Zucker JD, Vidal H, Laville M, Barsh GS, Basdevant A, Stich V, Cancellou R, Langin D. Weight loss regulates inflammation-related genes in white adipose tissue of obese subjects. *FASEB J*. 2004 Nov;18(14):1657-69.

Conlon I, Raff M. Size control in animal development. *Cell*. 1999 Jan 22;96(2):235-44.

Constantin G, Marconi S, Rossi B, Angiari S, Calderan L, Anghileri E, Gini B, Bach SD, Martinello M, Bifari F, Galiè M, Turano E, Budui S, Sbarbati A, Krampera M, Bonetti B. Adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Stem Cells*. 2009 Oct;27(10):2624-35.

Conus F, Allison DB, Rabasa-Lhoret R, St-Onge M, St-Pierre DH, Tremblay-Lebeau A, Poehlman ET. Metabolic and behavioral characteristics of metabolically obese but normal-weight women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Oct;89(10):5013-20.

Corvera S, Gealekman O. Adipose tissue angiogenesis: impact on obesity and type-2 diabetes. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Mar;1842(3):463-72.

Cousin B, Munoz O, Andre M, Fontanilles AM, Dani C, Cousin JL, Laharrague P, Casteilla L, Pénicaud L. A role for preadipocytes as macrophage-like cells. *FASEB J*. 1999 Feb;13(2):305-12.

Crandall DL, Hausman GJ, Kral JG. A review of the microcirculation of adipose tissue: anatomic, metabolic, and angiogenic perspectives. *Microcirculation*. 1997 Jun;4(2):211-32.

Crisan M, Chen CW, Corselli M, Andriolo G, Lazzari L, Péault B. Perivascular multipotent progenitor cells in human organs. *Ann N Y Acad Sci*. 2009 Sep;1176:118-23.

Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng PN, Traas J, Schugar R, Deasy BM, Badylak S, Buhring HJ, Giacobino JP, Lazzari L, Huard J, Péault B. A

perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 2008 Sep 11;3(3):301-13.

Cristancho AG, Lazar MA. Forming functional fat: a growing understanding of adipocyte differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011 Sep 28;12(11):722-34.

Crossno JT Jr, Majka SM, Grazia T, Gill RG, Klemm DJ. Rosiglitazone promotes development of a novel adipocyte population from bone marrow-derived circulating progenitor cells. *J Clin Invest*. 2006 Dec;116(12):3220-8.

Curat CA, Miranville A, Sengenès C, Diehl M, Tonus C, Busse R, Bouloumié A. From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes*. 2004 May;53(5):1285-92.

Da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2008 Sep;26(9):2287-99.

Da Silva Meirelles L, Sand TT, Harman RJ, Lennon DP, Caplan AI. MSC frequency correlates with blood vessel density in equine adipose tissue. *Tissue Eng Part A*. 2009 Feb;15(2):221-9.

De Courten B, de Courten MP, Dougherty S, Forbes JM, Potts JR, Considine RV. Insulin infusion reduces hepatocyte growth factor in lean humans. *Metabolism*. 2013 May;62(5):647-50.

De Francesco F, Tirino V, Desiderio V, Ferraro G, D'Andrea F, Giuliano M, Libondi G, Pirozzi G, De Rosa A, Papaccio G. Human CD34/CD90 ASCs are capable of growing as sphere clusters, producing high levels of VEGF and forming capillaries. *PLoS One*. 2009 Aug 6;4(8):e6537.

De Girolamo L, Stanco D, Salvatori L, Coroniti G, Arrigoni E, Silecchia G, Russo MA, Niada S, Petrangeli E, Brini AT. Stemness and osteogenic and adipogenic potential are differently impaired in subcutaneous and visceral adipose derived stem cells (ASCs) isolated from obese donors. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2013 Jan-Mar;26(1 Suppl):11-21.

De Jongh RT, Serné EH, IJzerman RG, de Vries G, Stehouwer CD. Impaired microvascular function in obesity: implications for obesity-associated

microangiopathy, hypertension, and insulin resistance. *Circulation*. 2004 Jun 1;109(21):2529-35.

Desai VD, Hsia HC, Schwarzbauer JE. Reversible modulation of myofibroblast differentiation in adipose-derived mesenchymal stem cells. *PLoS One*. 2014 Jan 23;9(1):e86865.

Després JP, Lemieux I. Abdominal obesity and metabolic syndrome. *Nature*. 2006 Dec 14;444(7121):881-7.

Dicker A, Aström G, Sjölin E, Hauner H, Arner P, van Harmelen V. The influence of preadipocyte differentiation capacity on lipolysis in human mature adipocytes. *Horm Metab Res*. 2007 Apr;39(4):282-7.

Divoux A, Clément K. Architecture and the extracellular matrix: the still unappreciated components of the adipose tissue. *Obes Rev*. 2011 May;12(5):e494-503.

Divoux A, Tordjman J, Lacasa D, Veyrie N, Hugol D, Aissat A, Basdevant A, Guerre-Millo M, Poitou C, Zucker JD, Bedossa P, Clément K. Fibrosis in human adipose tissue: composition, distribution, and link with lipid metabolism and fat mass loss. *Diabetes*. 2010 Nov;59(11):2817-25.

Djian P, Roncari AK, Hollenberg CH. Influence of anatomic site and age on the replication and differentiation of rat adipocyte precursors in culture. *J Clin Invest*. 1983 Oct;72(4):1200-8.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop DJ, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7.

Eckel RH, Kahn SE, Ferrannini E, Goldfine AB, Nathan DM, Schwartz MW, Smith RJ, Smith SR; Endocrine Society; American Diabetes Association; European Association for the Study of Diabetes. Obesity and type 2 diabetes: what can be unified and what needs to be individualized? *Diabetes Care*. 2011 Jun;34(6):1424-30.

Eissing L, Scherer T, Tödter K, Knippschild U, Greve JW, Buurman WA, Pinnschmidt HO, Rensen SS, Wolf AM, Bartelt A, Heeren J, Buettner C, Scheja L. De novo lipogenesis in human fat and liver is linked to ChREBP- β and metabolic health. *Nat Commun.* 2013;4:1528.

Entenmann G, Hauner H. Relationship between replication and differentiation in cultured human adipocyte precursor cells. *Am J Physiol.* 1996 Apr;270 (4 Pt 1):C1011-6.

Esau C, Kang X, Peralta E, Hanson E, Marcusson EG, Ravichandran LV, Sun Y, Koo S, Perera RJ, Jain R, Dean NM, Freier SM, Bennett CF, Lollo B, Griffey R. MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation. *J Biol Chem.* 2004 Dec 10;279(50):52361-5.

Eto H, Suga H, Inoue K, Aoi N, Kato H, Araki J, Doi K, Higashino T, Yoshimura K. Adipose injury-associated factors mitigate hypoxia in ischemic tissues through activation of adipose-derived stem/progenitor/stromal cells and induction of angiogenesis. *Am J Pathol.* 2011 May;178(5):2322-32.

Farmer SR. Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell Metab.* 2006 Oct;4(4):263-73.

Faust IM, Johnson PR, Stern JS, Hirsch J. Diet-induced adipocyte number increase in adult rats: a new model of obesity. *Am J Physiol.* 1978 Sep;235(3):E279-86.

Fernández M, Acuña MJ, Reyes M, Olivares D, Hirsch S, Bunout D, de la Maza MP. Proliferation and differentiation of human adipocyte precursor cells: differences between the preperitoneal and subcutaneous compartments. *J Cell Biochem.* 2010 Oct 15;111(3):659-64.

Fraser JK, Schreiber R, Strem B, Zhu M, Alfonso Z, Wulur I, Hedrick MH. Plasticity of human adipose stem cells toward endothelial cells and cardiomyocytes. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2006 Mar;3 Suppl 1:S33-7.

Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol.* 2006 Apr;24(4):150-4.

Frazier TP, Gimble JM, Devay JW, Tucker HA, Chiu ES, Rowan BG. Body mass index affects proliferation and osteogenic differentiation of human subcutaneous adipose tissue-derived stem cells. *BMC Cell Biol.* 2013 Aug 7;14:34.

Frisén J, Arner P. Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature.* 2008 Jun 5;453(7196):783-7.

Frühbeck Gema. Overview of Adipose Tissue and Its Role. in Obesity and Metabolic Disorders. In *Adipose Tissue Protocols*. Second Edition. Edited by Kaiping Yang. 2008. Editorial Humana Press.

Frye CA, Wu X, Patrick CW. Microvascular endothelial cells sustain preadipocyte viability under hypoxic conditions. *In vitro Cell Dev Biol Anim.* 2005 May-Jun; 41(5-6):160-4.

Fukumura D, Ushiyama A, Duda DG, Xu L, Tam J, Krishna V, Chatterjee K, Garkavtsev I, Jain RK. Paracrine regulation of angiogenesis and adipocyte differentiation during *in vivo* adipogenesis. *Circ Res.* 2003 Oct 31;93(9):e88-97.

Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest.* 2004 Dec; 114(12):1752-61.

Garvey WT, Maianu L, Huecksteadt TP, Birnbaum MJ, Molina JM, Ciaraldi TP. Pretranslational suppression of a glucose transporter protein causes insulin resistance in adipocytes from patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus and obesity. *J Clin Invest.* 1991 Mar;87(3):1072-81.

Gealekman O, Guseva N, Hartigan C, Apotheker S, Gorgoglione M, Gurav K, Tran KV, Straubhaar J, Nicoloso S, Czech MP, Thompson M, Perugini RA, Corvera S. Depot-specific differences and insufficient subcutaneous adipose tissue angiogenesis in human obesity. *Circulation.* 2011 Jan 18;123(2):186-94.

Gogg S, Smith U, Jansson PA. Increased MAPK activation and impaired insulin signaling in subcutaneous microvascular endothelial cells in type 2 diabetes: the role of endothelin-1. *Diabetes.* 2009 Oct;58(10):2238-45.

Gonzalez-Rey E, Gonzalez MA, Varela N, O'Valle F, Hernandez-Cortes P, Rico L, Büscher D, Delgado M. Human adipose-derived mesenchymal stem cells reduce inflammatory and T cell responses and induce regulatory T cells in vitro in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2010 Jan;69(1):241-8.

Goossens GH, Bizzarri A, Venteclef N, Essers Y, Cleutjens JP, Konings E, Jocken JW, Cajlakovic M, Ribitsch V, Clément K, Blaak EE. Increased adipose tissue oxygen tension in obese compared with lean men is accompanied by insulin resistance, impaired adipose tissue capillarization, and inflammation. *Circulation*. 2011 Jul 5;124(1):67-76.

Goossens GH. The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Physiol Behav*. 2008 May 23;94(2):206-18.

Greenstein AS, Khavandi K, Withers SB, Sonoyama K, Clancy O, Jeziorska M, Laing I, Yates AP, Pemberton PW, Malik RA, Heagerty AM. Local inflammation and hypoxia abolish the protective anticontractile properties of perivascular fat in obese patients. *Circulation*. 2009 Mar 31; 119(12):1661-70.

Grenier G, Scimè A, Le Grand F, Asakura A, Perez-Iratxeta C, Andrade-Navarro MA, Labosky PA, Rudnicki MA. Resident endothelial precursors in muscle, adipose, and dermis contribute to postnatal vasculogenesis. *Stem Cells*. 2007 Dec;25(12):3101-10.

Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol*. 2001 Oct;189(1):54-63.

Grundy SM, Brewer HB Jr, Cleeman JI, Smith SC Jr, Lenfant C; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association. Definition of metabolic syndrome: report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Feb;24(2):e13-8.

Grundy SM, Cleeman JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM, Savage PJ, Smith SC Jr, Spertus JA, Costa F; American Heart Association; National Heart, Lung, and Blood Institute.

Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*. 2005 Oct 25;112(17):2735-52.

Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008 May;9(5):367-77.

Gummersbach C, Hemmrich K, Kröncke KD, Suschek CV, Fehsel K, Pallua N. New aspects of adipogenesis: radicals and oxidative stress. *Differentiation*. 2009 Feb;77(2):115-20.

Gupta RK, Arany Z, Seale P, Mepani RJ, Ye L, Conroe HM, Roby YA, Kulaga H, Reed RR, Spiegelman BM. Transcriptional control of preadipocyte determination by Zfp423. *Nature*. 2010 Mar 25;464(7288):619-23.

Gupta RK, Mepani RJ, Kleiner S, Lo JC, Khandekar MJ, Cohen P, Frontini A, Bhowmick DC, Ye L, Cinti S, Spiegelman BM. Zfp423 expression identifies committed preadipocytes and localizes to adipose endothelial and perivascular cells. *Cell Metab*. 2012 Feb 8;15(2):230-9.

Guyton AC and Hall JE. *Tratado de Fisiología Médica*. 2011. Decimosegunda edición. Editorial Elsevier.

Hajer GR, van Haeften TW, Visseren FL. Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and vascular diseases. *Eur Heart J*. 2008 Dec;29(24):2959-71.

Halberg N, Khan T, Trujillo ME, Wernstedt-Asterholm I, Attie AD, Sherwani S, Wang ZV, Landskroner-Eiger S, Dineen S, Magalang UJ, Brekken RA, Scherer PE. Hypoxia-inducible factor 1 α induces fibrosis and insulin resistance in white adipose tissue. *Mol Cell Biol*. 2009 Aug; 29(16):4467-83.

Hardy OT, Perugini RA, Nicoloso SM, Gallagher-Dorval K, Puri V, Straubhaar J, Czech MP. Body mass index-independent inflammation in omental adipose tissue associated with insulin resistance in morbid obesity. *Surg Obes Relat Dis*. 2011 Jan-Feb;7(1):60-7.

Harford KA, Reynolds CM, McGillicuddy FC, Roche HM. Fats, inflammation and insulin resistance: insights to the role of macrophage and T-cell accumulation in adipose tissue. *Proc Nutr Soc.* 2011 Nov;70(4):408-17.

Hauner H, Petruschke T, Gries FA. Endothelin-1 inhibits the adipose differentiation of cultured human adipocyte precursor cells. *Metabolism.* 1994 Feb; 43(2):227-32.

Hausman DB, DiGirolamo M, Bartness TJ, Hausman GJ, Martin RJ. The biology of white adipocyte proliferation. *Obes Rev.* 2001 Nov;2(4):239-54.

Hausman GJ, Richardson RL. Adipose tissue angiogenesis. *J Anim Sci.* 2004 Mar;82(3):925-34.

Hayashi T, Boyko EJ, McNeely MJ, Leonetti DL, Kahn SE, Fujimoto WY. Visceral adiposity, not abdominal subcutaneous fat area, is associated with an increase in future insulin resistance in Japanese Americans. *Diabetes.* 2008 May;57(5):1269-75.

Henegar C, Tordjman J, Achard V, Lacasa D, Cremer I, Guerre-Millo M, Poitou C, Basdevant A, Stich V, Viguerie N, Langin D, Bedossa P, Zucker JD, Clement K. Adipose tissue transcriptomic signature highlights the pathological relevance of extracellular matrix in human obesity. *Genome Biol.* 2008 Jan 21;9(1):R14.

Herman MA, Peroni OD, Villoria J, Schön MR, Abumrad NA, Blüher M, Klein S, Kahn BB. A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism. *Nature.* 2012 Apr 19;484(7394):333-8.

Higuchi M, Disting GJ, Peshavariya H, Jiang F, Hsiao ST, Chan EC, Liu GS. Differentiation of human adipose-derived stem cells into fat involves reactive oxygen species and Forkhead box O1 mediated upregulation of antioxidant enzymes. *Stem Cells Dev.* 2013 Mar 15;22(6):878-88.

Hirschi KK, D'Amore PA. Pericytes in the microvasculature. *Cardiovasc Res.* 1996 Oct;32(4):687-98.

Hocking SL, Wu LE, Guilhaus M, Chisholm DJ, James DE. Intrinsic depot-specific differences in the secretome of adipose tissue, preadipocytes, and

adipose tissue-derived microvascular endothelial cells. *Diabetes*. 2010 Dec;59(12):3008-16.

Hong KM, Belperio JA, Keane MP, Burdick MD, Strieter RM. Differentiation of human circulating fibrocytes as mediated by transforming growth factor-beta and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem*. 2007 Aug 3;282(31):22910-20.

Hong KM, Burdick MD, Phillips RJ, Heber D, Strieter RM. Characterization of human fibrocytes as circulating adipocyte progenitors and the formation of human adipose tissue in SCID mice. *FASEB J*. 2005 Dec;19(14):2029-31.

Hong S, Lee C, Kim SJ. Smad7 sensitizes tumor necrosis factor induced apoptosis through the inhibition of antiapoptotic gene expression by suppressing activation of the nuclear factor-kappaB pathway. *Cancer Res*. 2007 Oct 1;67(19):9577-83.

Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A; International Society for Cellular Therapy. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2005;7(5):393-5.

Hosogai N, Fukuhara A, Oshima K, Miyata Y, Tanaka S, Segawa K, Furukawa S, Tochino Y, Komuro R, Matsuda M, Shimomura I. Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes*. 2007 Apr;56(4):901-11.

Huang S, Czech MP. The GLUT4 glucose transporter. *Cell Metab*. 2007 Apr;5(4):237-52.

Hube F, Hauner H. The two tumor necrosis factor receptors mediate opposite effects on differentiation and glucose metabolism in human adipocytes in primary culture. *Endocrinology*. 2000 Jul;141(7):2582-8.

Huffman DM, Barzilai N. Role of visceral adipose tissue in aging. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Oct;1790(10):1117-23.

Hutley LJ, Herington AC, Shurety W, Cheung C, Vesey DA, Cameron DP, Prins JB. Human adipose tissue endothelial cells promote preadipocyte proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2001 Nov; 281(5):E1037-44.

Hye Kim J, Gyu Park S, Kim WK, Song SU, Sung JH. Functional regulation of adipose-derived stem cells by PDGF-D. *Stem Cells*. 2015 Feb;33(2):542-56.

Ibrahim MM. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev*. 2010 Jan;11(1):11-8.

Ingram DA, Krier TR, Mead LE, McGuire C, Prater DN, Bhavsar J, Saadatzadeh MR, Bijangi-Vishehsaraei K, Li F, Yoder MC, Haneline LS. Clonogenic endothelial progenitor cells are sensitive to oxidative stress. *Stem Cells*. 2007 Feb;25(2):297-304.

Iozzo P. Viewpoints on the way to the consensus session: where does insulin resistance start? The adipose tissue. *Diabetes Care*. 2009 Nov;32 Suppl 2:S168-73.

Isakson P, Hammarstedt A, Gustafson B, Smith U. Impaired preadipocyte differentiation in human abdominal obesity: role of Wnt, tumor necrosis factor- α , and inflammation. *Diabetes*. 2009 Jul;58(7):1550-7.

Ivanova-Todorova E, Bochev I, Mourdjeva M, Dimitrov R, Bukarev D, Kyurkchiev S, Tivchev P, Altunkova I, Kyurkchiev DS. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are more potent suppressors of dendritic cells differentiation compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Immunol Lett*. 2009 Sep 22;126(1-2):37-42.

Jaenisch R, Young R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell*. 2008 Feb 22;132(4):567-82.

Jansson PA. Endothelial dysfunction in insulin resistance and type 2 diabetes. *J Intern Med*. 2007 Aug;262(2):173-83.

Jo J, Gavrilova O, Pack S, Jou W, Mullen S, Sumner AE, Cushman SW, Periwai V. Hypertrophy and/or Hyperplasia: Dynamics of Adipose Tissue Growth. *PLoS Comput Biol*. 2009 Mar;5(3):e1000324.

Joe AW, Yi L, Even Y, Vogl AW, Rossi FM. Depot-specific differences in adipogenic progenitor abundance and proliferative response to high-fat diet. *Stem Cells*. 2009 Oct;27(10):2563-70.

Jonk AM, Houben AJ, de Jongh RT, Serné EH, Schaper NC, Stehouwer CD. Microvascular dysfunction in obesity: a potential mechanism in the pathogenesis of obesity-associated insulin resistance and hypertension. *Physiology (Bethesda)*. 2007 Aug; 22:252-60.

Jonk AM, Houben AJ, Schaper NC, de Leeuw PW, Serné EH, Smulders YM, Stehouwer CD. Meal-related increases in microvascular vasomotion are impaired in obese individuals: a potential mechanism in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Diabetes Care*. 2011 May;34 Suppl 2:S342-8.

Kahn R. Metabolic syndrome: is it a syndrome? Does it matter? *Circulation*. 2007 Apr 3;115(13):1806-10.

Kamei N, Tobe K, Suzuki R, Ohsugi M, Watanabe T, Kubota N, Ohtsuka-Kowatari N, Kumagai K, Sakamoto K, Kobayashi M, Yamauchi T, Ueki K, Oishi Y, Nishimura S, Manabe I, Hashimoto H, Ohnishi Y, Ogata H, Tokuyama K, Tsunoda M, Ide T, Murakami K, Nagai R, Kadowaki T. Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. *J Biol Chem*. 2006 Sep 8;281(36):26602-14.

Kanda H, Tateya S, Tamori Y, Kotani K, Hiasa K, Kitazawa R, Kitazawa S, Miyachi H, Maeda S, Egashira K, Kasuga M. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance, and hepatic steatosis in obesity. *J Clin Invest*. 2006 Jun;116(6):1494-505.

Kanda S, Miyata Y, Kanetake H. Fibroblast growth factor-2-mediated capillary morphogenesis of endothelial cells requires signals via Flt-1/vascular endothelial growth factor receptor-1: possible involvement of c-Akt. *J Biol Chem*. 2004 Feb 6;279(6):4007-16.

Kang S, Akerblad P, Kiviranta R, Gupta RK, Kajimura S, Griffin MJ, Min J, Baron R, Rosen ED. Regulation of early adipose commitment by Zfp521. *PLoS Biol*. 2012;10(11):e1001433.

Keeley EC, Mehrad B, Strieter RM. The role of circulating mesenchymal progenitor cells (fibrocytes) in the pathogenesis of fibrotic disorders. *Thromb Haemost.* 2009 Apr;101(4):613-8.

Keeley EC, Mehrad B, Strieter RM. The role of fibrocytes in fibrotic diseases of the lungs and heart. *Fibrogenesis Tissue Repair.* 2011 Jan 10;4:2.

Keophiphath M, Achard V, Henegar C, Rouault C, Clément K, Lacasa D. Macrophage-secreted factors promote a profibrotic phenotype in human preadipocytes. *Mol Endocrinol.* 2009 Jan;23(1):11-24.

Khan T, Muise ES, Iyengar P, Wang ZV, Chandalia M, Abate N, Zhang BB, Bonaldo P, Chua S, Scherer PE. Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI. *Mol Cell Biol.* 2009 Mar;29(6):1575-91.

Khan T, Muise ES, Iyengar P, Wang ZV, Chandalia M, Abate N, Zhang BB, Bonaldo P, Chua S, Scherer PE. Metabolic dysregulation and adipose tissue fibrosis: role of collagen VI. *Mol Cell Biol.* 2009 Mar;29(6):1575-91

Kilroy GE, Foster SJ, Wu X, Ruiz J, Sherwood S, Heifetz A, Ludlow JW, Stricker DM, Potiny S, Green P, Halvorsen YD, Cheatham B, Storms RW, Gimble JM. Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors. *J Cell Physiol.* 2007 Sep;212(3):702-9.

Kim HK, Kim YJ, Kim JT, Kwon CH, Kim YK, Bae YC, Kim DH, Jung JS. Alterations in the proangiogenic functions of adipose tissue-derived stromal cells isolated from diabetic rats. *Stem Cells Dev.* 2008 Aug;17(4):669-80.

Kim JA, Montagnani M, Koh KK, Quon MJ. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction: molecular and pathophysiological mechanisms. *Circulation.* 2006 Apr 18;113(15):1888-904.

Kim JH, Park SG, Song SY, Kim JK, Sung JH. Reactive oxygen species-responsive miR-210 regulates proliferation and migration of adipose-derived stem cells via PTPN2. *Cell Death Dis.* 2013 Apr 11;4:e588.

Kim JH, Park SH, Park SG, Choi JS, Xia Y, Sung JH. The pivotal role of reactive oxygen species generation in the hypoxia-induced stimulation of adipose-derived stem cells. *Stem Cells Dev.* 2011 Oct;20(10):1753-61.

Kim JH, Song SY, Park SG, Song SU, Xia Y, Sung JH. Primary involvement of NADPH oxidase 4 in hypoxia-induced generation of reactive oxygen species in adipose-derived stem cells. *Stem Cells Dev.* 2012 Aug 10;21(12):2212-21

Kim JY, van de Wall E, Laplante M, Azzara A, Trujillo ME, Hofmann SM, Schraw T, Durand JL, Li H, Li G, Jelicks LA, Mehler MF, Hui DY, Deshaies Y, Shulman GI, Schwartz GJ, Scherer PE. Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *J Clin Invest.* 2007 Sep;117(9):2621-37.

Kintscher U, Hartge M, Hess K, Foryst-Ludwig A, Clemenz M, Wabitsch M, Fischer-Posovszky P, Barth TF, Dragun D, Skurk T, Hauner H, Blüher M, Unger T, Wolf AM, Knippschild U, Hombach V, Marx N. T-lymphocyte infiltration in visceral adipose tissue: a primary event in adipose tissue inflammation and the development of obesity-mediated insulin resistance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008 Jul;28(7):1304-10.

Kirkland JL, Hollenberg CH, Gillon WS. Two preadipocyte subtypes cloned from human omental fat. *Obes Res.* 1993 Mar;1(2):87-91.

Klimcakova E, Roussel B, Kovacova Z, Kovacikova M, Siklova-Vitkova M, Combes M, Hejnova J, Decaunes P, Maoret JJ, Vedral T, Viguerie N, Bourlier V, Bouloumié A, Stich V, Langin D. Macrophage gene expression is related to obesity and the metabolic syndrome in human subcutaneous fat as well as in visceral fat. *Diabetologia.* 2011 Apr;54(4):876-87.

Klötting N, Berthold S, Kovacs P, Schön MR, Fasshauer M, Ruschke K, Stumvoll M, Blüher M. MicroRNA expression in human omental and subcutaneous adipose tissue. *PLoS One.* 2009;4(3):e4699.

Klötting N, Fasshauer M, Dietrich A, Kovacs P, Schön MR, Kern M, Stumvoll M, Blüher M. Insulin-sensitive obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010 Sep;299(3):E506-15.

Knoblich JA. Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell*. 2008 Feb 22;132(4):583-97.

Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(1):204.

Kos K, Wilding JP. SPARC: a key player in the pathologies associated with obesity and diabetes. *Nat Rev Endocrinol*. 2010 Apr;6(4):225-35.

Kos K, Wong S, Tan B, Gummesson A, Jernas M, Franck N, Kerrigan D, Nystrom FH, Carlsson LM, Randeva HS, Pinkney JH, Wilding JP. Regulation of the fibrosis and angiogenesis promoter SPARC/osteonectin in human adipose tissue by weight change, leptin, insulin, and glucose. *Diabetes*. 2009 Aug;58(8):1780-8.

Kouidhi S, Berrhouma R, Rouissi K, Jarboui S, Clerget-Froidevaux MS, Seugnet I, Bchir F, Demeneix B, Guissouma H, Elgaaied AB. Human subcutaneous adipose tissue Glut 4 mRNA expression in obesity and type 2 diabetes. *Acta Diabetol*. 2013 Apr;50(2):227-32.

Kras KM, Hausman DB, Martin RJ. Tumor necrosis factor-alpha stimulates cell proliferation in adipose tissue-derived stromal-vascular cell culture: promotion of adipose tissue expansion by paracrine growth factors. *Obes Res*. 2000 Mar;8(2):186-93.

Kursawe R, Eszlinger M, Narayan D, Liu T, Bazuine M, Cali AM, D'Adamo E, Shaw M, Pierpont B, Shulman GI, Cushman SW, Sherman A, Caprio S. Cellularity and adipogenic profile of the abdominal subcutaneous adipose tissue from obese adolescents: association with insulin resistance and hepatic steatosis. *Diabetes*. 2010 Sep;59(9):2288-96.

Lacasa D, Taleb S, Keophiphath M, Miranville A, Clement K. Macrophage-secreted factors impair human adipogenesis: involvement of proinflammatory state in preadipocytes. *Endocrinology*. 2007 Feb;148(2):868-77.

Lai N, Jayaraman A, Lee K. Enhanced proliferation of human umbilical vein endothelial cells and differentiation of 3T3-L1 adipocytes in coculture. *Tissue Eng Part A*. 2009 May; 15(5):1053-61.

Lai N, Sims JK, Jeon NL, Lee K. Adipocyte induction of preadipocyte differentiation in a gradient chamber. *Tissue Eng Part C Methods*. 2012 Dec;18(12):958-67.

Lakshmipathy U, Hart RP. Concise review: MicroRNA expression in multipotent mesenchymal stromal cells. *Stem Cells*. 2008 Feb;26(2):356-63.

Lau DC, Shillabeer G, Wong KL, Tough SC, Russell JC. Influence of paracrine factors on preadipocyte replication and differentiation. *Int J Obes*. 1990; 14.

Laudes M. Role of WNT signalling in the determination of human mesenchymal stem cells into preadipocytes. *J Mol Endocrinol*. 2011 Mar 7;46(2):R65-72.

Lechleitner M. Obesity and the metabolic syndrome in the elderly—a mini-review. *Gerontology*. 2008;54(5):253-9.

Ledoux S, Queguiner I, Msika S, Calderari S, Rufat P, Gasc JM, Corvol P, Larger E. Angiogenesis associated with visceral and subcutaneous adipose tissue in severe human obesity. *Diabetes*. 2008 Dec;57(12):3247-57.

Lee EY, Xia Y, Kim WS, Kim MH, Kim TH, Kim KJ, Park BS, Sung JH. Hypoxia-enhanced wound-healing function of adipose-derived stem cells: increase in stem cell proliferation and up-regulation of VEGF and bFGF. *Wound Repair Regen*. 2009 Jul-Aug;17(4):540-7.

Lee H, Lee YJ, Choi H, Ko EH, Kim JW. Reactive oxygen species facilitate adipocyte differentiation by accelerating mitotic clonal expansion. *J Biol Chem*. 2009 Apr 17;284(16):10601-9.

Lee Mi-Jeong and Fried Susan K. Depot-specific biology of adipose tissue: links to fat distribution and metabolic risk. In *Adipose Tissue in Health and disease*. Edited by Todd Leff and James G Granneman, 2010. Editorial Wiley-Blackwell.

Lee YS, Kim AY, Choi JW, Kim M, Yasue S, Son HJ, Masuzaki H, Park KS, Kim JB. Dysregulation of adipose glutathione peroxidase 3 in obesity contributes to local and systemic oxidative stress. *Mol Endocrinol*. 2008 Sep;22(9):2176-89.

Lemoine AY, Ledoux S, Quéguiner I, Caldérari S, Mechler C, Msika S, Corvol P, Larger E. Link between adipose tissue angiogenesis and fat accumulation in severely obese subjects. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 May;97(5):E775-80.

Li B, Zeng Q, Wang H, Mao X. Effect of cytokines secreted by human adipose stromal cells on endothelial cells. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2006;26(4):396-8.

Li H, Zimmerlin L, Marra KG, Donnenberg VS, Donnenberg AD, Rubin JP. Adipogenic potential of adipose stem cell subpopulations. *Plast Reconstr Surg*. 2011 Sep;128(3):663-72.

Lijnen HR. Angiogenesis and obesity. *Cardiovasc Res*. 2008 May 1;78(2):286-93. Epub 2007 Aug 23.

Lin CS, Xin ZC, Deng CH, Ning H, Lin G, Lue TF. Defining adipose tissue-derived stem cells in tissue and in culture. *Histol Histopathol*. 2010 Jun;25(6):807-15.

Lin G, Garcia M, Ning H, Banie L, Guo YL, Lue TF, Lin CS. Defining stem and progenitor cells within adipose tissue. *Stem Cells Dev*. 2008 Dec;17(6):1053-63

Lin Q, Gao Z, Alarcon RM, Ye J, Yun Z. A role of miR-27 in the regulation of adipogenesis. *FEBS J*. 2009 Apr;276(8):2348-58.

Liu A, McLaughlin T, Liu T, Sherman A, Yee G, Abbasi F, Lamendola C, Morton J, Cushman SW, Reaven GM, Tsao PS. Differential intra-abdominal adipose tissue profiling in obese, insulin-resistant women. *Obes Surg*. 2009 Nov;19(11):1564-73.

Liu SP, Fu RH, Yu HH, Li KW, Tsai CH, Shyu WC, Lin SZ. MicroRNAs regulation modulated self-renewal and lineage differentiation of stem cells. *Cell Transplant*. 2009;18(9):1039-45.

Liyori N, Alonso LC, Li J, Sanders MH, Garcia-Ocana A, O'Doherty RM, Polotsky VY, O'Donnell CP. Intermittent hypoxia causes insulin resistance in lean mice independent of autonomic activity. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007 Apr 15;175(8):851-7.

Lönn M, Mehlig K, Bengtsson C, Lissner L. Adipocyte size predicts incidence of type 2 diabetes in women. *FASEB J*. 2010 Jan;24(1):326-31.

Lumeng CN, Deyoung SM, Bodzin JL, Saltiel AR. Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes*. 2007 Jan;56(1):16-23.

Mack I, BelAiba RS, Djordjevic T, Görlach A, Hauner H, Bader BL. Functional analyses reveal the greater potency of preadipocytes compared with adipocytes as endothelial cell activator under normoxia, hypoxia, and TNFalpha exposure. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2009 Sep;297(3):E735-48.

Madonna R, De Caterina R. In vitro neovasculo-genic potential of resident adipose tissue precursors. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008 Nov;295(5):C1271-80.

Majka SM, Barak Y, Klemm DJ. Concise review: adipocyte origins: weighing the possibilities. *Stem Cells*. 2011 Jul;29(7):1034-40.

Manea A, Manea SA, Florea IC, Luca CM, Raicu M. Positive regulation of NADPH oxidase 5 by proinflammatory-related mechanisms in human aortic smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med*. 2012 May 1;52(9):1497-507.

Manea A, Tanase LI, Raicu M, Simionescu M. Transcriptional regulation of NADPH oxidase isoforms, Nox1 and Nox4, by nuclear factor-kappaB in human aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 Jun 11;396(4):901-7.

Mariman EC, Wang P. Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity. *Cell Mol Life Sci*. 2010 Apr;67(8):1277-92.

Mariman EC, Wang P. Adipocyte extracellular matrix composition, dynamics and role in obesity. *Cell Mol Life Sci*. 2010 Apr;67(8):1277-92.

Marques BG, Hausman DB, Martin RJ. Association of fat cell size and paracrine growth factors in development of hyperplastic obesity. *Am J Physiol.* 1998 Dec;275(6 Pt 2):R1898-908.

Massagué J, Xi Q. TGF- β control of stem cell differentiation genes. *FEBS Lett.* 2012 Jul 4;586(14):1953-8.

Maumus M, Sengenès C, Decaunes P, Zakaroff-Girard A, Bourlier V, Lafontan M, Galitzky J, Bouloumié A. Evidence of in situ proliferation of adult adipose tissue-derived progenitor cells: influence of fat mass microenvironment and growth. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Oct;93(10):4098-106.

McGregor RA, Choi MS. microRNAs in the regulation of adipogenesis and obesity. *Curr Mol Med.* 2011 Jun;11(4):304-16.

McLaughlin T, Deng A, Gonzales O, Aillaud M, Yee G, Lamendola C, Abbasi F, Connolly AJ, Sherman A, Cushman SW, Reaven G, Tsao PS. Insulin resistance is associated with a modest increase in inflammation in subcutaneous adipose tissue of moderately obese women. *Diabetologia.* 2008 Dec;51(12):2303-8.

McLaughlin T, Deng A, Yee G, Lamendola C, Reaven G, Tsao PS, Cushman SW, Sherman A. Inflammation in subcutaneous adipose tissue: relationship to adipose cell size. *Diabetologia.* 2010 Feb;53(2):369-77.

McLaughlin T, Sherman A, Tsao P, Gonzalez O, Yee G, Lamendola C, Reaven GM, Cushman SW. Enhanced proportion of small adipose cells in insulin-resistant vs insulin-sensitive obese individuals implicates impaired adipogenesis. *Diabetologia.* 2007 Aug;50(8):1707-15.

McLaughlin TM, Liu T, Yee G, Abbasi F, Lamendola C, Reaven GM, Tsao P, Cushman SW, Sherman A. Pioglitazone increases the proportion of small cells in human abdominal subcutaneous adipose tissue. *Obesity (Silver Spring).* 2010 May;18(5):926-31.

Meran S, Martin J, Luo DD, Steadman R, Phillips A. Interleukin-1 β induces hyaluronan and CD44-dependent cell protrusions that facilitate fibroblast-monocyte binding. *Am J Pathol.* 2013 Jun;182(6):2223-40.

Merfeld-Clauss S, Gollahalli N, March KL, Traktuev DO. Adipose tissue progenitor cells directly interact with endothelial cells to induce vascular network formation. *Tissue Eng Part A*. 2010 Sep;16(9):2953-66.

Miller WH Jr, Faust IM, Hirsch J. Demonstration of de novo production of adipocytes in adult rats by biochemical and radioautographic techniques. *J Lipid Res*. 1984 Apr;25(4):336-47.

Minamino T, Orimo M, Shimizu I, Kunieda T, Yokoyama M, Ito T, Nojima A, Nabetani A, Oike Y, Matsubara H, Ishikawa F, Komuro I. A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nat Med*. 2009 Sep;15(9):1082-7.

Minamino T, Orimo M, Shimizu I, Kunieda T, Yokoyama M, Ito T, Nojima A, Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008 Dec;8(12):958-69.

Minamino T, Orimo M, Shimizu I, Kunieda T, Yokoyama M, Ito T, Nojima A, Nabetani A, Oike Y, Matsubara H, Ishikawa F, Komuro I. A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nat Med*. 2009 Sep;15(9):1082-7.

Miñana MD, Carbonell-Uberos F, Mirabet V, Marín S, Encabo A. IFATS collection: Identification of hemangioblasts in the adult human adipose tissue. *Stem Cells*. 2008 Oct;26(10):2696-704.

Miranville A, Heeschen C, Sengenès C, Curat CA, Busse R, Bouloumié A. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells. *Circulation*. 2004 Jul 20;110(3):349-55.

Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, Garrett S, Floyd ZE, Kloster A, Di Halvorsen Y, Storms RW, Goh B, Kilroy G, Wu X, Gimble JM. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells*. 2006 Feb;24(2):376-85.

Miyazawa-Hoshimoto S, Takahashi K, Bujo H, Hashimoto N, Saito Y. Elevated serum vascular endothelial growth factor is associated with visceral fat accumulation in human obese subjects. *Diabetologia*. 2003 Nov;46(11):1483-8.

Montesano R, Pepper MS, Orci L. Paracrine induction of angiogenesis *in vitro* by Swiss 3T3 fibroblasts. J Cell Sci. 1993 Aug; 105 (Pt 4):1013-24.

Moon MH, Kim SY, Kim YJ, Kim SJ, Lee JB, Bae YC, Sung SM, Jung JS. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve postnatal neovascularization in a mouse model of hindlimb ischemia. Cell Physiol Biochem. 2006;17(5-6):279-90.

Morgan MJ, Liu ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. Cell Res. 2011 Jan;21(1):103-15.

Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. Cell. 2008 Feb 22;132(4):598-611.

Morrone M, Giordano A, Zingaretti MC, Boiani R, De Matteis R, Kahn BB, Nisoli E, Tonello C, Pisoschi C, Luchetti MM, Marelli M, Cinti S. Reversible transdifferentiation of secretory epithelial cells into adipocytes in the mammary gland. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Nov 30;101(48):16801-6.

Mundi MS, Karpayak MV, Koutsari C, Votruba SB, O'Brien PC, Jensen MD. Body fat distribution, adipocyte size, and metabolic characteristics of nondiabetic adults. J Clin Endocrinol Metab. 2010 Jan;95(1):67-73.

Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. Nat Rev Immunol. 2011 Oct 14;11(11):723-37.

Nabetani A, Oike Y, Matsubara H, Ishikawa F, Komuro I. A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. Nat Med. 2009 Sep;15(9):1082-7.

Nakagami H, Morishita R, Maeda K, Kikuchi Y, Ogihara T, Kaneda Y. Adipose tissue-derived stromal cells as a novel option for regenerative cell therapy. J Atheroscler Thromb. 2006 Apr;13(2):77-81.

Nathan C, Ding A. Nonresolving inflammation. Cell. 2010 Mar 19;140(6):871-82.

Nelson David L. and Cox Michael M. Lehninger Principios de Bioquímica. 2009. Quinta Edición. Editorial Omega.

Nie J, Sage EH. SPARC inhibits adipogenesis by its enhancement of beta-catenin signaling. *J Biol Chem*. 2009 Jan 9;284(2):1279-90.

Niesler CU, Siddle K, Prins JB. Human preadipocytes display a depot-specific susceptibility to apoptosis. *Diabetes*. 1998 Aug;47(8):1365-8.

Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Eto K, Yamashita H, Ohsugi M, Otsu M, Hara K, Ueki K, Sugiura S, Yoshimura K, Kadowaki T, Nagai R. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nat Med*. 2009 Aug;15(8):914-20.

Nishimura S, Manabe I, Nagasaki M, Hosoya Y, Yamashita H, Fujita H, Ohsugi M, Tobe K, Kadowaki T, Nagai R, Sugiura S. Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells, and blood vessels. *Diabetes*. 2007 Jun; 56(6):1517-26.

Noer A, Sørensen AL, Boquest AC, Collas P. Stable CpG hypomethylation of adipogenic promoters in freshly isolated, cultured, and differentiated mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Mol Biol Cell*. 2006 Aug;17(8):3543-56.

Oliva-Olivera W, Gea AL, Lhamyani S, Coín-Aragüez L, Torres JA, Bernal-López MR, Luna PP, Conde SM, Fernández-Veledo M, El Bekay R, Tinahones FJ. Differences in the osteogenic differentiation capacity of omental adipose derived stem cells in obese patients with and without metabolic syndrome. *Endocrinology*. 2015 Sep 15:en 20151413. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 26372179.

Oñate B, Vilahur G, Ferrer-Lorente R, Ybarra J, Díez-Caballero A, Ballesta-López C, Moscatiello F, Herrero J, Badimon L. The subcutaneous adipose tissue reservoir of functionally active stem cells is reduced in obese patients. *FASEB J*. 2012 Oct;26(10):4327-36.

O'Rourke RW, White AE, Metcalf MD, Olivas AS, Mitra P, Larison WG, Cheang EC, Varlamov O, Corless CL, Roberts CT Jr, Marks DL. Hypoxia-induced inflammatory cytokine secretion in human adipose tissue stromovascular cells. *Diabetologia*. 2011 Jun;54(6):1480-90.

Ortega FJ, Moreno-Navarrete JM, Pardo G, Sabater M, Hummel M, Ferrer A, Rodríguez-Hermosa JI, Ruiz B, Ricart W, Peral B, Fernández-Real JM. MiRNA expression profile of human subcutaneous adipose and during adipocyte differentiation. *PLoS One*. 2010 Feb 2;5(2):e9022.

Pang C, Gao Z, Yin J, Zhang J, Jia W, Ye J. Macrophage infiltration into adipose tissue may promote angiogenesis for adipose tissue remodeling in obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008 Aug; 295(2):E313-22.

Park BS, Kim WS, Choi JS, Kim HK, Won JH, Ohkubo F, Fukuoka H. Hair growth stimulated by conditioned medium of adipose-derived stem cells is enhanced by hypoxia: evidence of increased growth factor secretion. *Biomed Res*. 2010 Feb;31(1):27-34.

Park HT, Lee ES, Cheon YP, Lee DR, Yang KS, Kim YT, Hur JY, Kim SH, Lee KW, Kim T. The relationship between fat depot-specific preadipocyte differentiation and metabolic syndrome in obese women. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012 Jan;76(1):59-66.

Park SG, Kim JH, Xia Y, Sung JH. Generation of reactive oxygen species in adipose-derived stem cells: friend or foe? *Expert Opin Ther Targets*. 2011 Nov;15(11):1297-306.

Pasarica M, Gowronska-Kozak B, Burk D, Remedios I, Hymel D, Gimble J, Ravussin E, Bray GA, Smith SR. Adipose tissue collagen VI in obesity. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009 Dec;94(12):5155-62.

Pasarica M, Rood J, Ravussin E, Schwarz JM, Smith SR, Redman LM. Reduced oxygenation in human obese adipose tissue is associated with impaired insulin suppression of lipolysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010 Aug;95(8):4052-5.

Pasarica M, Sereda OR, Redman LM, Albarado DC, Hymel DT, Roan LE, Rood JC, Burk DH, Smith SR. Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity: evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response. *Diabetes*. 2009 Mar;58(3):718-25.

Pasarica M, Xie H, Hymel D, Bray G, Greenway F, Ravussin E, Smith SR. Lower total adipocyte number but no evidence for small adipocyte depletion in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2009 May;32(5):900-2.

Peinado JR, Jimenez-Gomez Y, Pulido MR, Ortega-Bellido M, Diaz-Lopez C, Padillo FJ, Lopez-Miranda J, Vazquez-Martínez R, Malagón MM. The stromal-vascular fraction of adipose tissue contributes to major differences between subcutaneous and visceral fat depots. *Proteomics*. 2010 Sep;10(18):3356-66.

Pelosi E, Valtieri M, Coppola S, Botta R, Gabbianelli M, Lulli V, Marziali G, Masella B, Müller R, Sgadari C, Testa U, Bonanno G, Peschle C. Identification of the hemangioblast in postnatal life. *Blood*. 2002 Nov 1;100(9):3203-8.

Permana PA, Nair S, Lee YH, Luczy-Bachman G, Vozarova De Courten B, Tataranni PA. Subcutaneous abdominal preadipocyte differentiation in vitro inversely correlates with central obesity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004 Jun;286(6):E958-62.

Peterson CL. Transcriptional memory: mothers SET the table for daughters. *Curr Biol*. 2010 Mar 9;20(5):R240-2.

Petruschke T, Hauner H. Tumor necrosis factor-alpha prevents the differentiation of human adipocyte precursor cells and causes delipidation of newly developed fat cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993 Mar;76(3):742-7.

Petruschke T, Röhrig K, Hauner H. Transforming growth factor beta (TGF-beta) inhibits the differentiation of human adipocyte precursor cells in primary culture. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1994 Aug;18(8):532-6.

Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views. *Stem Cells*. 2007 Nov;25(11):2896-902.

Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, André M, Nibbelink M, Tamarat R, Clergue M, Manneville C, Saillan-Barreau C, Duriez M, Tedgui A, Levy B, Pénicaud L, Casteilla L. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*. 2004 Feb 10;109(5):656-63.

Plourde G, Karelis AD. Current issues in the identification and treatment of metabolically healthy but obese individuals. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2014 May;24(5):455-9.

Porcheray F, Viaud S, Rimaniol AC, Léone C, Samah B, Dereuddre-Bosquet N, Dormont D, Gras G. Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clin Exp Immunol*. 2005 Dec;142(3):481-9.

Primeau V, Coderre L, Karelis AD, Brochu M, Lavoie ME, Messier V, Sladek R, Rabasa-Lhoret R. Characterizing the profile of obese patients who are metabolically healthy. *Int J Obes (Lond)*. 2011 Jul;35(7):971-81.

Prins JB, Niesler CU, Winterford CM, Bright NA, Siddle K, O'Rahilly S, Walker NI, Cameron DP. Tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis of human adipose cells. *Diabetes*. 1997 Dec;46(12):1939-44.

Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, Taureau C, Cousin B, Abbal M, Laharrague P, Penicaud L, Casteilla L, Blancher A. Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol*. 2005 Apr;129(1):118-29.

Qin L, Chen Y, Niu Y, Chen W, Wang Q, Xiao S, Li A, Xie Y, Li J, Zhao X, He Z, Mo D. A deep investigation into the adipogenesis mechanism: profile of microRNAs regulating adipogenesis by modulating the canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway. *BMC Genomics*. 2010 May 23;11:320.

Rada T, Reis RL, Gomes ME. Distinct stem cells subpopulations isolated from human adipose tissue exhibit different chondrogenic and osteogenic differentiation potential. *Stem Cell Rev*. 2011 Mar;7(1):64-76.

Rajashekhar G, Traktuev DO, Roell WC, Johnstone BH, Merfeld-Clauss S, Van Natta B, Rosen ED, March KL, Clauss M. IFATS collection: Adipose stromal cell differentiation is reduced by endothelial cell contact and paracrine communication: role of canonical Wnt signaling. *Stem Cells*. 2008 Oct;26(10):2674-81.

Ramalho-Santos M, Willenbring H. On the origin of the term "stem cell". *Cell Stem Cell*. 2007 Jun 7;1(1):35-8.

Rasmussen JG, Frøbert O, Pilgaard L, Kastrup J, Simonsen U, Zachar V, Fink T. Prolonged hypoxic culture and trypsinization increase the pro-angiogenic potential of human adipose tissue-derived stem cells. *Cytotherapy*. 2011 Mar;13(3):318-28.

Rausch ME, Weisberg S, Vardhana P, Tortoriello DV. Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration. *Int J Obes (Lond)*. 2008 Mar;32(3):451-63.

Rees AJ. Monocyte and macrophage biology: an overview. *Semin Nephrol*. 2010 May;30(3):216-33.

Regazzetti C, Peraldi P, Grémeaux T, Najem-Lendom R, Ben-Sahra I, Cormont M, Bost F, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF, Giorgetti-Peraldi S. Hypoxia decreases insulin signaling pathways in adipocytes. *Diabetes*. 2009 Jan;58(1):95-103.

Rehman J, Considine RV, Bovenkerk JE, Li J, Slavens CA, Jones RM, March KL. Obesity is associated with increased levels of circulating hepatocyte growth factor. *J Am Coll Cardiol*. 2003 Apr 16;41(8):1408-13.

Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell CL, Johnstone BH, Considine RV, March KL. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*. 2004 Mar 16;109(10):1292-8.

Rider DA, Dombrowski C, Sawyer AA, Ng GH, Leong D, Hutmacher DW, Nurcombe V, Cool SM. Autocrine fibroblast growth factor 2 increases the multipotentiality of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2008 Jun;26(6):1598-608.

Rigamonti A, Brennand K, Lau F, Cowan CA. Rapid cellular turnover in adipose tissue. *PLoS One*. 2011 Mar 2;6(3):e17637.

Rodeheffer MS, Birsoy K, Friedman JM. Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo. *Cell*. 2008 Oct 17;135(2):240-9.

Roelen BA, Dijke Pt. Controlling mesenchymal stem cell differentiation by TGF β family members. *J Orthop Sci*. 2003;8(5):740-8.

Roldan M, Macias-Gonzalez M, Garcia R, Tinahones FJ, Martin M. Obesity short-circuits stemness gene network in human adipose multipotent stem cells. *FASEB J*. 2011 Dec;25(12):4111-26.

Rosen ED, MacDougald OA. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006 Dec;7(12):885-96.

Rosen ED, Spiegelman BM. Molecular regulation of adipogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2000;16:145-71.

Ross MH and Pawlina W. *Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular*. 2006. Quinta edición. Editorial Médica Panamericana.

Rubina K, Kalinina N, Efimenko A, Lopatina T, Melikhova V, Tsokolaeva Z, Sysoeva V, Tkachuk V, Parfyonova Y. Adipose stromal cells stimulate angiogenesis via promoting progenitor cell differentiation, secretion of angiogenic factors, and enhancing vessel maturation. *Tissue Eng Part A*. 2009 Aug;15(8):2039-50.

Rupnick MA, Panigrahy D, Zhang CY, Dallabrida SM, Lowell BB, Langer R, Folkman MJ. Adipose tissue mass can be regulated through the vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Aug 6;99(16):10730-5.

Rutkowski JM, Davis KE, Scherer PE. Mechanisms of obesity and related pathologies: the macro- and microcirculation of adipose tissue. *FEBS J*. 2009 Oct;276(20):5738-46.

Salminen A, Kauppinen A, Kaarniranta K. Emerging role of NF- κ B signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Cell Signal*. 2012 Apr;24(4):835-45.

Samulin J, Lien S, Grindflek E, Berget I, Ruyter B, Sundvold H. Depot specific differences during adipogenesis of porcine stromal-vascular cells. *Cell Biol Int*. 2008 May;32(5):525-31.

Satani K, Konya H, Hamaguchi T, Umehara A, Katsuno T, Ishikawa T, Kohri K, Hasegawa Y, Suehiro A, Kakishita E, Namba M. Clinical significance of circulating hepatocyte growth factor, a new risk marker of carotid atherosclerosis in patients with Type 2 diabetes. *Diabet Med*. 2006 Jun;23(6):617-22.

Schäffler A, Büchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells*. 2007 Apr;25(4):818-27.

Schnoor M, Cullen P, Lorkowski J, Stolle K, Robenek H, Troyer D, Rauterberg J, Lorkowski S. Production of type VI collagen by human macrophages: a new dimension in macrophage functional heterogeneity. *J Immunol*. 2008 Apr 15; 180(8):5707-19.

Scott RA, Fall T, Pasko D, Barker A, Sharp SJ, Arriola L, Balkau B, Barricarte A, Barroso I, Boeing H, Clavel-Chapelon F, Crowe FL, Dekker JM, Fagherazzi G, Ferrannini E, Forouhi NG, Franks PW, Gavrila D, Giedraitis V, Grioni S, Groop LC, Kaaks R, Key TJ, Kühn T, Lotta LA, Nilsson PM, Overvad K, Palli D, Panico S, Quirós JR, Rolandsson O, Roswall N, Sacerdote C, Sala N, Sánchez MJ, Schulze MB, Siddiq A, Slimani N, Sluijs I, Spijkerman AM, Tjonneland A, Tumino R, van der A DL, Yaghootkar H; RISC Study Group; EPIC-InterAct Consortium, McCarthy MI, Semple RK, Riboli E, Walker M, Ingelsson E, Frayling TM, Savage DB, Langenberg C, Wareham NJ. Common genetic variants highlight the role of insulin resistance and body fat distribution in type 2 diabetes, independent of obesity. *Diabetes*. 2014 Dec;63(12):4378-87.

Sengenès C, Lolmède K, Zakaroff-Girard A, Busse R, Bouloumié A. Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult mesenchymal and hematopoietic stem cells. *J Cell Physiol*. 2005 Oct;205(1):114-22.

Sengenès C, Miranville A, Maumus M, de Barros S, Busse R, Bouloumié A. Chemotaxis and differentiation of human adipose tissue CD34+/CD31- progenitor cells: role of stromal derived factor-1 released by adipose tissue capillary endothelial cells. *Stem Cells*. 2007 Sep; 25(9):2269-76.

Serné EH, de Jongh RT, Eringa EC, IJzerman RG, Stehouwer CD. Microvascular dysfunction: a potential pathophysiological role in the metabolic syndrome. *Hypertension*. 2007 Jul;50(1):204-11.

Seta N, Kuwana M. Derivation of multipotent progenitors from human circulating CD14+ monocytes. *Exp Hematol*. 2010 Jul;38(7):557-63.

Sethi JK, Vidal-Puig AJ. Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J Lipid Res*. 2007 Jun;48(6):1253-62.

Shi M, Liu ZW, Wang FS. Immunomodulatory properties and therapeutic application of mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol*. 2011 Apr;164(1):1-8.

Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006 Jul;116(7):1793-801.

Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 2007 Mar;92(3):1023-33.

Song SY, Chung HM, Sung JH. The pivotal role of VEGF in adipose-derived-stem-cell-mediated regeneration. *Expert Opin Biol Ther*. 2010 Nov;10(11):1529-37.

Spencer M, Unal R, Zhu B, Rasouli N, McGehee RE Jr, Peterson CA, Kern PA. Adipose tissue extracellular matrix and vascular abnormalities in obesity and insulin resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011 Dec; 96(12):E1990-8.

Spencer M, Yao-Borengasser A, Unal R, Rasouli N, Gurley CM, Zhu B, Peterson CA, Kern PA. Adipose tissue macrophages in insulin-resistant subjects are associated with collagen VI and fibrosis and demonstrate

alternative activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010 Dec; 299(6):E1016-27.

Stout RD, Jiang C, Matta B, Tietzel I, Watkins SK, Suttles J. Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences. *J Immunol.* 2005 Jul 1;175(1):342-9.

Strem BM, Hicok KC, Zhu M, Wulur I, Alfonso Z, Schreiber RE, Fraser JK, Hedrick MH. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med.* 2005 Sep;54(3):132-41.

Strissel KJ, Stancheva Z, Miyoshi H, Perfield JW 2nd, DeFuria J, Jick Z, Greenberg AS, Obin MS. Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes.* 2007 Dec;56(12):2910-8.

Suga H, Eto H, Aoi N, Kato H, Araki J, Doi K, Higashino T, Yoshimura K. Adipose tissue remodeling under ischemia: death of adipocytes and activation of stem/progenitor cells. *Plast Reconstr Surg.* 2010 Dec;126(6):1911-23.

Takahashi M, Nagaretani H, Funahashi T, Nishizawa H, Maeda N, Kishida K, Kuriyama H, Shimomura I, Maeda K, Hotta K, Ouchi N, Kihara S, Nakamura T, Yamashita S, Matsuzawa Y. The expression of SPARC in adipose tissue and its increased plasma concentration in patients with coronary artery disease. *Obes Res.* 2001 Jul;9(7):388-93.

Takahashi M, Suzuki E, Oba S, Nishimatsu H, Kimura K, Nagano T, Nagai R, Hirata Y. Adipose tissue-derived stem cells inhibit neointimal formation in a paracrine fashion in rat femoral artery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010 Feb;298(2):H415-23.

Tan CK, Leuenberger N, Tan MJ, Yan YW, Chen Y, Kambadur R, Wahli W, Tan NS. Smad3 deficiency in mice protects against insulin resistance and obesity induced by a high-fat diet. *Diabetes.* 2011 Feb;60(2):464-76.

Tan CY, Vidal-Puig A. Adipose tissue expandability: the metabolic problems of obesity may arise from the inability to become more obese. *Biochem Soc Trans.* 2008 Oct;36(Pt 5):935-40.

Tang W, Zeve D, Suh JM, Bosnakovski D, Kyba M, Hammer RE, Tallquist MD, Graff JM. White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science*. 2008 Oct 24;322(5901):583-6.

Tárnok A, Ulrich H, Bocsi J. Phenotypes of stem cells from diverse origin. *Cytometry A*. 2010 Jan;77(1):6-10.

Tartare-Deckert S, Chavey C, Monthouel MN, Gautier N, Van Obberghen E. The matricellular protein SPARC/osteonectin as a newly identified factor up-regulated in obesity. *J Biol Chem*. 2001 Jun 22;276(25):22231-7.

Tchkonia T, Giorgadze N, Pirtskhalava T, Tchoukalova Y, Karagiannides I, Forse RA, DePonte M, Stevenson M, Guo W, Han J, Waloga G, Lash TL, Jensen MD, Kirkland JL. Fat depot origin affects adipogenesis in primary cultured and cloned human preadipocytes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002 May;282(5):R1286-96.

Tchkonia T, Giorgadze N, Pirtskhalava T, Thomou T, DePonte M, Koo A, Forse RA, Chinnappan D, Martin-Ruiz C, von Zglinicki T, Kirkland JL. Fat depot-specific characteristics are retained in strains derived from single human preadipocytes. *Diabetes*. 2006 Sep;55(9):2571-8.

Tchkonia T, Lenburg M, Thomou T, Giorgadze N, Frampton G, Pirtskhalava T, Cartwright A, Cartwright M, Flanagan J, Karagiannides I, Gerry N, Forse RA, Tchoukalova Y, Jensen MD, Pothoulakis C, Kirkland JL. Identification of depot-specific human fat cell progenitors through distinct expression profiles and developmental gene patterns. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007 Jan;292(1):E298-307.

Tchkonia T, Morbeck DE, Von Zglinicki T, Van Deursen J, Lustgarten J, Scrable H, Khosla S, Jensen MD, Kirkland JL. Fat tissue, aging, and cellular senescence. *Aging Cell*. 2010 Oct;9(5):667-84.

Tchkonia T, Tchoukalova YD, Giorgadze N, Pirtskhalava T, Karagiannides I, Forse RA, Koo A, Stevenson M, Chinnappan D, Cartwright A, Jensen MD, Kirkland JL. Abundance of two human preadipocyte subtypes with distinct

capacities for replication, adipogenesis, and apoptosis varies among fat depots. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2005 Jan;288(1):E267-77.

Tchkonia T, Zhu Y, van Deursen J, Campisi J, Kirkland JL. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. J Clin Invest. 2013 Mar;123(3):966-72.

Tchoukalova YD, Votruba SB, Tchkonia T, Giorgadze N, Kirkland JL, Jensen MD. Regional differences in cellular mechanisms of adipose tissue gain with overfeeding. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Oct 19;107(42):18226-31.

Thangarajah H, Vial IN, Chang E, El-Ftesi S, Januszyk M, Chang EI, Paterno J, Neofytou E, Longaker MT, Gurtner GC. IFATS collection: Adipose stromal cells adopt a proangiogenic phenotype under the influence of hypoxia. Stem Cells. 2009 Jan;27(1):266-74.

Thomou Thomas, Tamara Tchkonia, and James L. Kirkland. Cellular and Molecular basis of functional differences among fat depots. In Adipose Tissue in Health and disease. Edited by Todd Leff and James G Granneman, 2010. Editorial Wiley-Blackwell.

Tirziu D, Simons M. Endothelium as master regulator of organ development and growth. Vascul Pharmacol. 2009 Jan-Feb;50(1-2):1-7.

Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RD, Huang P. Redox regulation of cell survival. Antioxid Redox Signal. 2008 Aug;10(8):1343-74.

Traktuev DO, Merfeld-Clauss S, Li J, Kolonin M, Arap W, Pasqualini R, Johnstone BH, March KL. A population of multipotent CD34-positive adipose stromal cells share pericyte and mesenchymal surface markers, reside in a periendothelial location, and stabilize endothelial networks. Circ Res. 2008 Jan 4;102(1):77-85.

Traktuev DO, Prater DN, Merfeld-Clauss S, Sanjeevaiah AR, Saadatzadeh MR, Murphy M, Johnstone BH, Ingram DA, March KL. Robust functional vascular network formation *in vivo* by cooperation of adipose progenitor and endothelial cells. Circ Res. 2009 Jun 19;104(12):1410-20.

Tran TT, Yamamoto Y, Gesta S, Kahn CR. Beneficial effects of subcutaneous fat transplantation on metabolism. *Cell Metab*. 2008 May;7(5):410-20.

Travis MA, Sheppard D. TGF- β activation and function in immunity. *Annu Rev Immunol*. 2014;32:51-82.

Trayhurn P, Wang B, Wood IS. Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity? *Br J Nutr*. 2008 Aug;100(2):227-35.

Trayhurn P. Adipocyte biology. *Obes Rev*. 2007 Mar;8 Suppl 1:41-4.

Trayhurn P. Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity. *Physiol Rev*. 2013 Jan;93(1):1-21.

Tsukagawa E, Adachi H, Hirai Y, Enomoto M, Fukami A, Ogata K, Kasahara A, Yokoi K, Imaizumi T. Independent association of elevated serum hepatocyte growth factor levels with development of insulin resistance in a 10-year prospective study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2013 Jul;79(1):43-8.

Ushio-Fukai M, Urao N. Novel role of NADPH oxidase in angiogenesis and stem/progenitor cell function. *Antioxid Redox Signal*. 2009 Oct;11(10):2517-33.

Van Harmelen V, Röhrig K, Hauner H. Comparison of proliferation and differentiation capacity of human adipocyte precursor cells from the omental and subcutaneous adipose tissue depot of obese subjects. *Metabolism*. 2004 May;53(5):632-7.

van Harmelen V, Skurk T, Röhrig K, Lee YM, Halbleib M, Aprath-Husmann I, Hauner H. Effect of BMI and age on adipose tissue cellularity and differentiation capacity in women. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003 Aug;27(8):889-95.

Varzaneh FE, Shillabeer G, Wong KL, Lau DC. Extracellular matrix components secreted by microvascular endothelial cells stimulate preadipocyte differentiation in vitro. *Metabolism*. 1994 Jul; 43(7):906-12.

Vega GL, Adams-Huet B, Peshock R, Willett D, Shah B, Grundy SM. Influence of body fat content and distribution on variation in metabolic risk. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006 Nov;91(11):4459-66.

Verseijden F, Jahr H, Posthumus-van Sluijs SJ, Ten Hagen TL, Hovius SE, Seynhaeve AL, van Neck JW, van Osch GJ, Hofer SO. Angiogenic capacity of human adipose-derived stromal cells during adipogenic differentiation: an *in vitro* study. *Tissue Eng Part A*. 2009 Feb; 15(2):445-52

Verseijden F, Posthumus-van Sluijs SJ, Pavljasevic P, Hofer SO, van Osch GJ, Farrell E. Adult human bone marrow- and adipose tissue-derived stromal cells support the formation of prevascular-like structures from endothelial cells *in vitro*. *Tissue Eng Part A*. 2010 Jan;16(1):101-14.

Villageois P, Wdziekonski B, Zaragosi LE, Plaisant M, Mohsen-Kanson T, Lay N, Ladoux A, Peraldi P, Dani C. Regulators of human adipose-derived stem cell self-renewal. *Am J Stem Cells*. 2011 Aug 18;1(1):42-7.

Villaret A, Galitzky J, Decaunes P, Estève D, Marques MA, Sengenès C, Chiotasso P, Tchkonja T, Lafontan M, Kirkland JL, Bouloumié A. Adipose tissue endothelial cells from obese human subjects: differences among depots in angiogenic, metabolic, and inflammatory gene expression and cellular senescence. *Diabetes*. 2010 Nov;59(11):2755-63.

Vincent HK, Taylor AG. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obes (Lond)*. 2006 Mar;30(3):400-18.

Virtue S, Vidal-Puig A. It's not how fat you are, it's what you do with it that counts. *PLoS Biol*. 2008 Sep 23;6(9):e237.

Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell*. 2004 Mar 5;116(5):639-48.

Wagner W, Wein F, Seckinger A, Frankhauser M, Wirkner U, Krause U, Blake J, Schwager C, Eckstein V, Ansorge W, Ho AD. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol*. 2005 Nov;33(11):1402-16.

Wei X, Du Z, Zhao L, Feng D, Wei G, He Y, Tan J, Lee WH, Hampel H, Dodel R, Johnstone BH, March KL, Farlow MR, Du Y. IFATS collection: The conditioned media of adipose stromal cells protect against hypoxia-ischemia-induced brain damage in neonatal rats. *Stem Cells*. 2009 Feb;27(2):478-88.

Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003 Dec;112(12):1796-808.

Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):157-68.

Wentworth JM, Naselli G, Brown WA, Doyle L, Phipson B, Smyth GK, Wabitsch M, O'Brien PE, Harrison LC. Pro-inflammatory CD11c+CD206+ adipose tissue macrophages are associated with insulin resistance in human obesity. *Diabetes*. 2010 Jul;59(7):1648-56.

Weyer C, Foley JE, Bogardus C, Tataranni PA, Pratley RE. Enlarged subcutaneous abdominal adipocyte size, but not obesity itself, predicts type II diabetes independent of insulin resistance. *Diabetologia*. 2000 Dec;43(12):1498-506.

Winer S, Chan Y, Paltser G, Truong D, Tsui H, Bahrami J, Dorfman R, Wang Y, Zielenski J, Mastronardi F, Maezawa Y, Drucker DJ, Engleman E, Winer D, Dosch HM. Normalization of obesity-associated insulin resistance through immunotherapy. *Nat Med*. 2009 Aug;15(8):921-9.

Wood IS, de Heredia FP, Wang B, Trayhurn P. Cellular hypoxia and adipose tissue dysfunction in obesity. *Proc Nutr Soc*. 2009 Nov;68(4):370-7.

Wosnitza M, Hemmrich K, Groger A, Gräber S, Pallua N. Plasticity of human adipose stem cells to perform adipogenic and endothelial differentiation. *Differentiation*. 2007 Jan;75(1):12-23.

Wu D, Molofsky AB, Liang HE, Ricardo-Gonzalez RR, Jouihan HA, Bando JK, Chawla A, Locksley RM. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. *Science*. 2011 Apr 8;332(6026):243-7.

Wu H, Ghosh S, Perrard XD, Feng L, Garcia GE, Perrard JL, Sweeney JF, Peterson LE, Chan L, Smith CW, Ballantyne CM. T-cell accumulation and regulated on activation, normal T cell expressed and secreted upregulation in adipose tissue in obesity. *Circulation*. 2007 Feb 27;115(8):1029-38.

Xu H, Barnes GT, Yang Q, Tan G, Yang D, Chou CJ, Sole J, Nichols A, Ross JS, Tartaglia LA, Chen H. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest*. 2003 Dec;112(12):1821-30.

Yadav H, Quijano C, Kamaraju AK, Gavrilova O, Malek R, Chen W, Zervas P, Zhigang D, Wright EC, Stuelten C, Sun P, Lonning S, Skarulis M, Sumner AE, Finkel T, Rane SG. Protection from obesity and diabetes by blockade of TGF- β /Smad3 signaling. *Cell Metab*. 2011 Jul 6;14(1):67-79.

Yan X, Chen YG. Smad7: not only a regulator, but also a cross-talk mediator of TGF- β signalling. *Biochem J*. 2011 Feb 15;434(1):1-10.

Ye J. Adipose tissue vascularization: its role in chronic inflammation. *Curr Diab Rep*. 2011 Jun;11(3):203-10.

Ye J. Emerging role of adipose tissue hypoxia in obesity and insulin resistance. *Int J Obes (Lond)*. 2009 Jan;33(1):54-66.

You L, Pan L, Chen L, Chen JY, Zhang X, Lv Z, Fu D. Suppression of zinc finger protein 467 alleviates osteoporosis through promoting differentiation of adipose derived stem cells to osteoblasts. *J Transl Med*. 2012 Jan 17;10:11.

Yun Z, Maecker HL, Johnson RS, Giaccia AJ. Inhibition of PPAR gamma 2 gene expression by the HIF-1-regulated gene DEC1/Stra13: a mechanism for regulation of adipogenesis by hypoxia. *Dev Cell*. 2002 Mar;2(3):331-41.

Zannettino AC, Paton S, Arthur A, Khor F, Itescu S, Gimble JM, Gronthos S. Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo. *J Cell Physiol*. 2008 Feb;214(2):413-21.

Zaragosi LE, Ailhaud G, Dani C. Autocrine fibroblast growth factor 2 signaling is critical for self-renewal of human multipotent adipose-derived stem cells. *Stem Cells*. 2006 Nov;24(11):2412-9.

Zeve D, Tang W, Graff J. Fighting fat with fat: the expanding field of adipose stem cells. *Cell Stem Cell*. 2009 Nov 6;5(5):472-81.

Zeyda M, Farmer D, Todoric J, Aszmann O, Speiser M, Györi G, Zlabinger GJ, Stulnig TM. Human adipose tissue macrophages are of an anti-inflammatory phenotype but capable of excessive pro-inflammatory mediator production. *Int J Obes (Lond)*. 2007 Sep;31(9):1420-8.

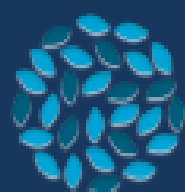
Zeyda M, Stulnig TM. Adipose tissue macrophages. *Immunol Lett*. 2007 Oct 15;112(2):61-7.

Zhou S, Lechpammer S, Greenberger JS, Glowacki J. Hypoxia inhibition of adipocytogenesis in human bone marrow stromal cells requires transforming growth factor-beta/Smad3 signaling. *J Biol Chem*. 2005 Jun 17;280(24):22688-96.

Zimmerlin L, Donnenberg VS, Pfeifer ME, Meyer EM, Péault B, Rubin JP, Donnenberg AD. Stromal vascular progenitors in adult human adipose tissue. *Cytometry A*. 2010 Jan;77(1):22-30.

Zipori D. The stem state: plasticity is essential, whereas self-renewal and hierarchy are optional. *Stem Cells*. 2005 Jun-Jul;23(6):719-26.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002 Dec;13(12):4279-95.



ibima

Instituto de Investigación
Biomédica de Málaga



Publicaciones y
Divulgación Científica

UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

cíberobn

Centro de Investigación Biomédica en Red
Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición